



การตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค High resolution melting (HRM) analysis



ศิริพัฒน์ ม่วงป่า

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค High resolution melting (HRM) analysis



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วย
เทคนิค High resolution melting (HRM) analysis"

ของ ศิริพัฒน์ ม่วงป่า

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงลักษณ์ ยิ้มตระกูล)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ นพ.พีระพล วอง)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ พุทธชาติ)

อนุมัติ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค High resolution melting (HRM) analysis
ผู้วิจัย	ศิริพัฒน์ ม่วงป่า
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงลักษณ์ ยิ้มตระกูล
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นพ.พีระพล วอง
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563
คำสำคัญ	ฮีโมโกลบินผิดปกติ, เทคนิค high resolution melting, real-time PCR

บทคัดย่อ

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาเป็นหนึ่งในความผิดปกติที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ส่งผลให้มีการตรวจวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินในประชากร และพบฮีโมโกลบินผิดปกติมากขึ้น ซึ่งเกือบทุกชนิดไม่สามารถให้การวินิจฉัยที่ถูกต้องได้ในงานตรวจประจำวัน ส่งผลกระทบต่อการวางแผนรักษา และการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมแก่ตัวผู้ป่วยและครอบครัว จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องได้รับการตรวจยืนยันในระดับดีเอ็นเอ ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้พัฒนาเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 6 คู่ ครอบคลุมบริเวณฮีนแอลฟาโกลบิน 2 (*HBA2*) และแอลฟาโกลบิน 1 (*HBA1*) สามารถตรวจยืนยันฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาจากตัวอย่างเลือด และตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาจำนวน 51 ตัวอย่าง ประกอบด้วย Hb Constant Spring 21 ตัวอย่าง, Hb Pakse' 3 ตัวอย่าง, Hb Quong Sze 1 ตัวอย่าง, Hb Pak Num Po 1 ตัวอย่าง, Hb Thailand 1 ตัวอย่าง, Hb Q-Thailand 17 ตัวอย่าง, Hb Queens 1 ตัวอย่าง, Hb Hekinan 3 ตัวอย่าง, Hb Siam 1 ตัวอย่าง, Hb Anantharaj 1 ตัวอย่าง และ Hb Nakhon Ratchasima 1 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ประสบความสำเร็จในการระบุฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาทั้ง 11 ชนิด ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis และทุกตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกับการตรวจด้วยเทคนิค DNA sequencing จึงกล่าวได้ว่า การตรวจยืนยันฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis มีความถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และอาจนำไปใช้ในการตรวจยืนยันฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย



Title	DETECTION OF ALPHA HEMOGLOBIN VARIANTS BY USING HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) ANALYSIS
Author	SIRIPHAT MUANGPA
Advisor	Assistant Professor Nonglak Yimtragoon, Ph.D.
Co-Advisor	Associate Professor Peerapon Wong, M.D.
Academic Paper	M.S. Thesis in Biological Sciences, Naresuan University, 2020
Keywords	Hb variant, high resolution melting analysis, real-time PCR

ABSTRACT

Alpha Hemoglobin (Hb) variants are one of the common gene disorders that found in Thailand, a number of Hb analyses and identification of Hb variants in Thai population have been increasingly encountered but most of them cannot be diagnosed in routine setting. Accurate diagnoses of these variants are important for planning of appropriate management and genetic counseling for the patients and their family. However, this inconclusive phenotypic result requires verification using DNA analysis. The aim of this study, we developed real-time PCR technique with HRM analysis and designed 6 primer pairs covering *HBA2* and *HBA1* regions to confirm the diagnosis of alpha Hb variants in blood and DNA samples were obtained from 51 subjects including, 10 Hb Constant Spring, 3 Hb Pakse', 1 Hb Quong Sze, 1 Hb Pak Num Po, 1 Hb Thailand, 17 Hb Q-Thailand, 1 Hb Queens, 3 Hb Hekinan, 1 Hb Siam, 1 Hb Anantharaj and 1 Hb Nakhon Ratchasima. Hb variants were collected at the Thalassemia Research unit, Naresuan University Hospital. The results of all samples were found to successful in identifying 11 types of alpha Hb variant by real-time PCR with HRM analysis and of all samples were consistent with the DNA sequencing technique. In conclusion, the diagnosis of alpha Hb variants using real-time PCR with HRM analysis has high accuracy and it is also a rapid and easy technique which can be used for the diagnosis of various Hb variants.



ประกาศคุณูปการ

ผมขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงลักษณ์ ยิ้มตระกูล ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุทิศสละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ อันประกอบไปด้วย รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พีระพล วอง กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ พุทธชาติ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นายแพทย์ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ พุ้เจริญ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัย และพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศาสตราจารย์ ดร.สาคร พรประเสริฐ คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือด และตัวอย่างดีเอ็นเอ ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวสวิชญาพร เจริญนิม, นางสาวปรีศนา เจริญพร, นางสาววันรัตน์ สนวนุ่ม, นางสาวมณฑิรา จันทร์อิน และนางสุดาลักษณ์ ฉิมเสื่อ พี่ๆ ที่น่ารัก ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้คอยให้ความรู้ และกำลังใจที่สำคัญ ขอขอบคุณทุกมิตรภาพที่คอยหล่อเลี้ยง และผลักดันให้ในทุกๆ วันของรั้วมหาวิทยาลัยแห่งนี้เต็มไปด้วยรอยยิ้ม และเสียงหัวเราะตลอดเวลา โดยเฉพาะเพื่อนสนิทของผม นางสาวสุดารัตน์ เกษมชลธาร และ นางสาวอัจฉราภรณ์ ใจเอื้อน ไม่ว่าจะเกิดอะไรขึ้น ผมเชื่อว่าพวกเราจะผ่านมันไปได้เสมออย่างที่เป็นมา

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ พ่อ และ แม่ ของผมที่ให้กำลังใจ สำหรับการสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุด และผมหวังเสมอว่าพ่อจะรับรู้ ถึงความสำเร็จในปริญญานี้ ไม่ว่าจะทางใดทางหนึ่ง ขอขอบคุณพ่อที่สอนผมให้โตเป็นเด็กที่กล้าแสดงออก รู้จักตั้งคำถาม และทำให้ผมรักในการเรียนรู้อยู่เสมอ ขอขอบคุณแม่ที่คอยให้ทุกพลังบวกในการใช้ชีวิต ไม่ว่าจะอะไรจะเกิดขึ้นแม่ก็จะคอยรอผมกลับบ้านอยู่เสมอ ขอขอบคุณพี่สาวผู้เข้มแข็ง และเป็นเสาหลักสำคัญที่ช่วยดูแลผมเสมือนแม่คนที่สอง

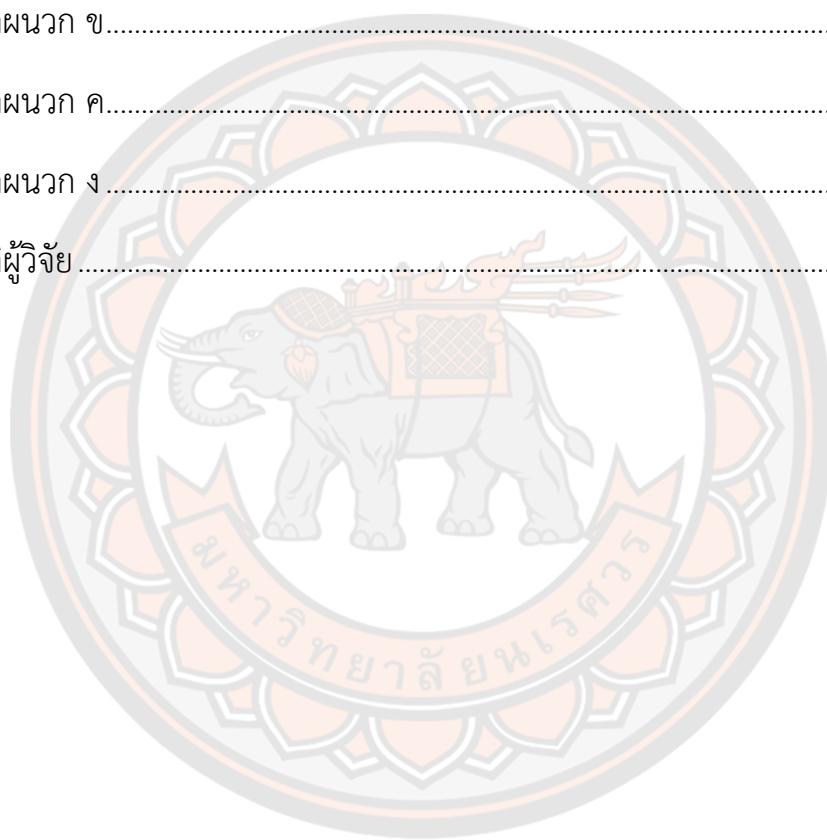
สุดท้ายนี้ผมขอขอบคุณ ทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) และทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว.) ประจำปีงบประมาณ 2563

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุุณุปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	4
สมมุติฐานของการวิจัย.....	4
บทที่ 2.....	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ฮีโมโกลบิน (hemoglobin).....	6
โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia).....	10
การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing and Quantitation).....	12
ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา (alpha hemoglobin variants).....	14

เทคนิค High resolution melting (HRM) analysis.....	19
บทที่ 3	22
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	22
การเก็บตัวอย่าง.....	23
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด.....	23
การทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 (HBA2) และยีนแอลฟาโกลบิน 1 (HBA1) และการทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์.....	24
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis	26
การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis	29
การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค HRM analysis	31
บทที่ 4	32
ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการวิจัย.....	32
การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง.....	32
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด.....	33
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ด้วยเทคนิค PCR.....	34
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis.....	36
การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR.....	38
การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis	44
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค HRM analysis กับเทคนิค DNA sequencing.....	61
บทที่ 5	72

บทสรุป.....	72
สรุปผลการวิจัย.....	72
บรรณานุกรม.....	75
ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก.....	83
ภาคผนวก ข.....	86
ภาคผนวก ค.....	88
ภาคผนวก ง.....	91
ประวัติผู้วิจัย.....	92



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1	ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาต่างๆ ที่มีการรายงานพบในประเทศไทย.....	16
ตาราง 2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	25
ตาราง 3	สภาวะที่เหมาะสมของคู่ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	25
ตาราง 4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	26
ตาราง 5	สภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิในช่วง Annealing ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ...	30
ตาราง 6	จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยจำแนกตามชนิดการกลายพันธุ์	33
ตาราง 7	ค่าวัดการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ	34
ตาราง 8	สภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของไพรเมอร์..	42
ตาราง 9	ชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติ และเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องจากการตรวจด้วย	62
ตาราง 10	ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา และรายงานการก่อโรค.....	71
ตาราง 11	ตัวอย่างทดลองแสดงชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ และผล DNA Sequencing	83

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1	กลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน, บีตาโกลบิน และระดับการแสดงออกของยีนโกลบิน 8
ภาพ 2	โครงสร้างแบบปฐมภูมิ และทุติยภูมิ พร้อมลำดับกรดอะมิโนของโกลบิน 9
ภาพ 3	การวิเคราะห์ Hb Q-Thailand ปรากฏในตำแหน่งเดียวกับฮีโมโกลบินเอฟ ...13
ภาพ 4	ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิ และการลดลงของสารเรืองแสง ...20
ภาพ 5	แผนภาพวิธีการดำเนินการวิจัย22
ภาพ 6	การวางตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบของยีนแอลฟาโกลบิน 2.....28
ภาพ 7	ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2.....35
ภาพ 8	ตำแหน่งไพรเมอร์ E1F/E1R (สีเหลือง) และไพรเมอร์ E12F/E12R (สีเขียว) .36
ภาพ 9	ตำแหน่งไพรเมอร์ E4TF/E4TR (สีเหลือง) และไพรเมอร์ EQF/EQR (สีเขียว)..37
ภาพ 10	ตำแหน่งไพรเมอร์ CSF/CSR (สีเขียว) และไพรเมอร์ E5F/E5R (สีเขียว).....38
ภาพ 11	ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ E1F/E1R (ซ้าย) และไพรเมอร์ E12F/E12R (ขวา).....39
ภาพ 12	ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ E4TF/E4TR (ซ้าย) และไพรเมอร์ EQF/EQR (ขวา)40
ภาพ 13	ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ CSF/CSR (ซ้าย) และไพรเมอร์ E5F/ER (ขวา)41
ภาพ 14	ความเข้มข้น $MgCl_2$ ส่งผลต่อลักษณะของ Normalized melting curve43
ภาพ 15	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....45
ภาพ 16	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....46
ภาพ 17	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง).....47
ภาพ 18	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....48
ภาพ 19	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง).....49

ภาพ 20	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....	50
ภาพ 21	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....	51
ภาพ 22	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง).....	52
ภาพ 23	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....	53
ภาพ 24	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....	54
ภาพ 25	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง).....	55
ภาพ 26	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....	56
ภาพ 27	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....	57
ภาพ 28	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง).....	58
ภาพ 29	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....	59
ภาพ 30	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง).....	60
ภาพ 31	Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง).....	61
ภาพ 32	ผล DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Hekinan, Hb Siam ...	63
ภาพ 33	DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Thailand, Hb Queens....	66
ภาพ 34	ผล DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Q-Thailand.....	68
ภาพ 35	ผล DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Constant Spring.....	69
ภาพ 36	ผล DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Pak Num Po.....	70
ภาพ 37	Chromatogram ของ Hb Hekinan ร่วมกับแอลฟาซีโรทาลัสซีเมียชนิด SEA....	86
ภาพ 38	Chromatogram ของ Hb Hekinan เกิดร่วมกับ Unknow mutation.....	86
ภาพ 39	การเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่ง codon 56 (HBA2:c.56 AAG>GAG).....	87
ภาพ 40	Chromatogram ของ Hb Nakhon Ratchasima	87
ภาพ 41	ความเข้มข้น $MgCl_2$ ส่งผลต่อลักษณะของ Normalized melting curve	88

- ภาพ 42 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ส่งผลต่อลักษณะของ melt peak จากการทดสอบ .89
- ภาพ 43 เอกสารรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์91



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา (alpha hemoglobin variant) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีนแอลฟาโกลบิน ซึ่งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แอลฟาโกลบินโปรตีน การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อชนิดของกรดอะมิโน หรือความสามารถ ในการสังเคราะห์ของยีนได้ลดลง (Clarke & Higgins, 2000) ทำให้การทำงานของฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลงไป ในปัจจุบันมีการตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาเป็นจำนวนมากกว่า 1,000 ชนิด (Shih et al., 2010) ซึ่งการระบาวิทยาของชนิดการกลายพันธุ์จะแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ สำหรับประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบความผิดปกตินี้มากกว่า 30 ชนิด นับได้ว่าเป็นประเทศที่มีความชุกและอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก (Srivorakun et al., 2014) นอกจากนี้ฮีโมโกลบินผิดปกติบางชนิดยังสามารถเกิดร่วมกับโรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) ทำให้เกิดพยาธิสภาพและความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของความผิดปกติที่พบทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคมีความซับซ้อนยากต่อการระบุชนิดความผิดปกติได้อย่างชัดเจน

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เพื่อระบุชนิดของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ จึงมีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในการควบคุมและการป้องกันโรคธาลัสซีเมีย การตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน (Hb typing) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (high pressure liquid chromatography : HPLC) และโครมาโทกราฟีเหลวความดันต่ำ (low pressure liquid chromatography : LPLC) พบว่าฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาหลายชนิดมีค่า Retention time (RT) ที่ใกล้เคียงกันมาก บางชนิดมีการซ้อนทับกันกับฮีโมโกลบินปกติหรือฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่น จึงไม่สามารถวินิจฉัยได้อย่างถูกต้องชัดเจนจำเป็นต้องมีการตรวจยืนยันในระดับดีเอ็นเอต่อไป (Jindadamrongwech et al., 2010)

ในบรรดาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่มีการรายงาน พบว่าบางชนิดจัดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่ก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย (thalassemic hemoglobinopathy) กล่าวคือ นอกจากสังเคราะห์เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติแล้ว ปริมาณที่สังเคราะห์ก็ยังน้อยกว่าปกติอีกด้วย ตัวอย่างที่พบได้บ่อยในประเทศไทย เช่น Hb Constant Spring, Hb Pakse' และ Hb Q-Thailand นอกจากนี้ยังพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งมีหลายชนิดที่พบในประเทศไทย เช่น Hb Anantharaj, Hb Hekinan, Hb Siam, Hb Queens, Hb J Buda และ Hb Thailand เป็นต้น

การที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งชนิดที่ก่อให้เกิด และไม่เกิดโรคธาลัสซีเมีย จึงชี้ให้เห็นว่าการตรวจวินิจฉัยเพื่อระบุ และแยกชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติเหล่านี้ล้วนมีความสำคัญต่อการวางแผนในการดูแลรักษา ตลอดจนจนถึงการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรมแก่ผู้ป่วย (Clarke & Higgins, 2000)

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาบางชนิดสามารถพบร่วมกับโรคธาลัสซีเมีย และก่อให้เกิดโรคโลหิตจางที่มีความรุนแรงแตกต่างกันไป จากการศึกษาพบว่าประเทศไทยมีการระบาดของวิทยาของฮีโมโกลบินผิดปกติที่สำคัญอย่าง Hb Constant Spring สูงถึง 1-12 เปอร์เซ็นต์ และยังพบการระบาดของแอลฟาธาลัสซีเมียถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ (Fucharoen & Winichagoon, 2011) การเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่าง Hb Hb Constant Spring กับแอลฟาธาลัสซีเมียก่อให้เกิดโรคในกลุ่มที่เรียกว่า Hb H disease ผู้ป่วย Hb H-CS disease หลายราย มีอาการซีดรุนแรง พบตับ และม้ามโต จำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการถ่ายเลือด และส่วนใหญ่มีอาการรุนแรงมากกว่าโรค Hb H ชนิด Deletion (Boonsa et al., 2004) นอกจากนี้ ยังพบ Hb Pakse' ที่พบได้บ่อยในประชากรไทย ทั้งในแถบภาคอีสาน ภาคกลาง และภาคเหนือ โดย Hb Pakse' สามารถพบร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย และก่อให้เกิด โรค Hb H-Pakse disease ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งมีอาการทางคลินิก และลักษณะแสดงออกทางโลหิตวิทยาที่ไม่แตกต่างกับ ผู้ป่วย Hb H-CS disease อีกทั้งฮีโมโกลบินผิดปกติหลายชนิดมีความไม่เสถียร และพบได้น้อยในการตรวจวิเคราะห์ Hb typing หรืออาจตรวจไม่พบเลย ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การวินิจฉัยโรคได้ ดังนั้นการตรวจยืนยันในระดับดีเอ็นเอ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก ในการตรวจวินิจฉัยโรค โดยเฉพาะในกลุ่มของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่อาจก่อให้เกิด Hb H disease อีกทั้งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาถึงความชุกของฮีโมโกลบินผิดปกติในแต่ละพื้นที่ได้อีกด้วย

การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟามีสาเหตุหลักเกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (point mutation) ทำให้เทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันได้แก่ Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) รวมไปถึง DNA sequencing แม้จะเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ตามห้องปฏิบัติการ แต่ก็มีข้อจำกัดคือมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ อีกทั้งไม่สะดวกในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก และมีค่าใช้จ่ายสูง (Shih et al., 2010) ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค HRM analysis ที่มีความสามารถในการตรวจการกลายพันธุ์ และการแปรผันในลำดับนิวคลีโอไทด์ (scanning of mutation and sequence variants) สามารถแยกความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดี โดยเฉพาะชนิดที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 bp (Zhou et al., 2004) ซึ่งมีความเหมาะสมอย่างยิ่ง ต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า เทคนิค HRM analysis เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม เทคนิค HRM analysis จัดเป็นวิธี

ที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความยืดหยุ่นในการประยุกต์ใช้ ลดต้นทุนในการวิเคราะห์ และที่สำคัญ มีความถูกต้องแม่นยำสูง เมื่อเทียบกับวิธีอื่นดังที่ได้กล่าวมา

การตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา จึงมีความสำคัญ ต่อการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติ สมควรได้รับการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เพื่อรองรับกับจำนวนผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตรวจวินิจฉัย อีกทั้งยังเพิ่ม ความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมียให้มีความครอบคลุม ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา และการตรวจโรคธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่ได้เกิดการจากการขาดหายไป ของยีน ทั้งชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทยรวมถึงชนิดใหม่ที่อาจพบได้ในอนาคต โดยการออกแบบ ไพรเมอร์หลายคู่ ให้มีความจำเพาะ และครอบคลุมบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน รวมไปถึงอาศัยหลักการ ตรวจด้วยเทคนิค HRM analysis ที่มีการวิเคราะห์ผลออกมาในรูปแบบของ Melting cruve และมีลักษณะที่จำเพาะในแต่ละจีโนไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติ การพบรูปแบบของ Melting cruve ที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม สามารถช่วยในการตรวจพบรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ได้อีกด้วย ซึ่งเทคนิค HRM analysis เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่ถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ชนิด การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา เป็นประโยชน์ ต่อการศึกษาในด้านฐานข้อมูล และทางด้านระบาดวิทยาของฮีโมโกลบินผิดปกติในเขตภาคเหนือตอนล่างให้มีความชัดเจนได้ยิ่งขึ้น

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

พัฒนาการตรวจการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบได้ในประเทศไทย ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง

ความสำคัญของการวิจัย

โครงการวิจัยชิ้นนี้ต้องการมุ่งเน้นการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุชนิด และตำแหน่งการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ในการวิเคราะห์ โดยปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เช่น Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) และ DNA sequencing ต่างก็มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีขั้นตอนซับซ้อน ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง และใช้ระยะเวลา งานวิจัยนี้ จึงได้พัฒนาเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis มาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อระบุชนิด และตำแหน่งการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาได้ครอบคลุมชนิดที่พบได้บ่อย ในประเทศไทยมีความถูกต้องแม่นยำสูง และลดระยะเวลา รวมทั้งต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ อีกทั้ง ยังมุ่งเน้น เพื่อนำมาบรรจุเพิ่มเติมในวิธีในการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติ

ชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis สำหรับการควบคุมโรคธาลัสซีเมีย ภายในหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย เป็นการเพิ่มความสามารถในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย ในเขตภาคเหนือ ตอนล่างอย่างครบวงจรยิ่งขึ้น และอาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาคความชุก รวมถึงระบาดวิทยา เพื่อร่วมกัน พัฒนาการวินิจฉัย การป้องกันควบคุม และการรักษาโรคธาลัสซีเมียต่อไปในอนาคต

ขอบเขตการวิจัย

1. ขอบเขตด้านการศึกษา

งานวิจัยนี้ทำการศึกษากการวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ด้วยการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis เป็นวิธีในการระบุชนิดการกลายพันธุ์ ชนิดที่พบได้ในประเทศไทยจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ Hb Constant Spring, Hb Pakse', Hb Quong Sze, Hb Q-Thailand, Hb Hekinan, Hb Anantharaj, Hb Siam, Hb Queens, Hb Nakhon Ratchasima, Hb Pak Num Po และ Hb Thailand ที่อยู่ในบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน

2. ขอบเขตด้านเวลา

งานวิจัยนี้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยชนิด และรูปแบบการ กลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมียศูนย์ โลहितวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ระหว่างเดือน มกราคม 2562 ถึงธันวาคม 2563

สมมุติฐานของการวิจัย

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่มีรายงานการตรวจพบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ Hb Q-Thailand, Hb Hekinann, Hb Quong Sze, Hb Constant Spring และ Hb Pakse' (Yimniam and Jindadamrongwech, 2016) มีรูปแบบการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของกรดอะมิโน (single amino acid substitution) ในสายแอลฟา โกลบินโปรตีน ทำให้เกิดการต่อสายของกรดอะมิโนที่ยาวผิดปกติ หรือหยุดการสังเคราะห์โปรตีน ก่อนกำหนด จึงทำให้คุณสมบัติของฮีโมโกลบิน เปลี่ยนแปลง และมีผลกระทบต่อการทำงาน จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis มีความเหมาะสมสำหรับ ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีการรายงานพบว่า เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis มีความเหมาะสม และมีข้อได้เปรียบในการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรวมถึงการเพิ่ม (insertion) หรือการขาดหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดี เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ

(Suwannasing et al., 2016) นอกจากนี้ ยังคาดการณ์ว่าการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ และครอบคลุมบริเวณยีนแอลฟาไกลบิน 2 (*HBA2*) และยีนแอลฟาไกลบิน 1 (*HBA1*) ที่ทำการศึกษา ในโครงการวิจัยนี้จะสามารถใช้เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์สำหรับฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งชนิดที่พบได้บ่อยรวมไปถึงรองรับชนิดใหม่ที่อาจพบได้ในอนาคต



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาการตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ ในการระบุชนิดการกลายพันธุ์ที่พบได้ในประเทศไทยได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง สามารถแยกความแตกต่างของผู้ที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาได้ และพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ที่ครอบคลุมรูปแบบ และชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาชนิด ที่พบได้บ่อยในประเทศไทยรวมถึงชนิดใหม่ที่อาจพบได้ในอนาคต จากการค้นคว้าเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง สามารถแบ่งหัวข้อได้ 5 หัวข้อ ดังนี้

1. ฮีโมโกลบิน (hemoglobin)
2. โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia)
3. การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb Typing and Quantitation)
4. ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา (alpha hemoglobin variants)
5. เทคนิค High resolution melting (HRM) analysis

ฮีโมโกลบิน (hemoglobin)

ฮีโมโกลบิน (hemoglobin, Hb) เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญภายในเม็ดเลือดแดง มีลักษณะเป็นโปรตีนก้อนกลมประกอบไปด้วยหน่วยย่อยจำนวน 4 หน่วย (tetrameric protein subunits) ได้แก่ 2 หน่วยย่อย จากสายโกลบินโปรตีนในกลุ่มแอลฟา (alpha-like globin chain) และ 2 หน่วยย่อย จากสายโกลบินโปรตีนในกลุ่มบีตา (beta-like globin chain) โดยในแต่ละหน่วยย่อยจะมีฮีม (heme) ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นธาตุเหล็กในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) อยู่ภายในวงแหวนเพอร์ฟีลีน (porphyrin ring) ฮีโมโกลบินจึงทำหน้าที่สำคัญในการขนส่งออกซิเจน จากปอดไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย และนำคาร์บอนไดออกไซด์กลับเข้าสู่ปอด (Farashi & Harteveld, 2018)

สายโกลบินโปรตีนในกลุ่มแอลฟา ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 141 ตัว ถูกสังเคราะห์ จากกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน (alpha-like globin gene cluster) บนโครโมโซมแท่งที่ 16 (16p13.3) ขนาดประมาณ 30 kb มี 3 Exon และ 2 Intron ประกอบไปด้วย ยีนซีตาโกลบิน (*zeta-globin, HBZ*),

ยีนแอลฟาโกลบิน 2 (*alpha-globin 2, HBA2*), ยีนแอลฟาโกลบิน 1 (*alpha-globin 1, HBA1*) และยีนเทียม 3 ยีน (*pseudogene*) ประกอบด้วย ยีนเทียมซีตาโกลบิน (*pseudo zeta-globin, HBZps*), ยีนเทียมแอลฟาโกลบิน 1 (*pseudo alpha-globin 1, HBA1ps*) และยีนเทียมแอลฟาโกลบิน 2 (*pseudo alpha-globin 2, HBM*) นอกจากนี้ยังปรากฏ ยีนทีตาโกลบิน (*theta-globin, HBQ*) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏอยู่บริเวณทางด้านปลาย 3' ของกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน เนื่องจากไม่พบว่า มีการแสดงออกในระดับโปรตีน และไม่พบการรายงานความผิดปกติที่เกิดจากการขาดหายไปของยีนทีตาโกลบิน (Farashi & Hartevelde, 2018)

สายโกลบินโปรตีนในกลุ่มบีตา ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 146 ตัว ถูกสังเคราะห์จากกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (*beta-like globin gene cluster*) บนโครโมโซมแท่งที่ 11 (11p15.15) มีขนาดประมาณ 70 kb มี 3 Exon และ 2 Intron ประกอบไปด้วย 5 ยีน ได้แก่ ยีนเอปไซลอนโกลบิน (*epsilon-globin, HBE*), ยีนจีแกมมาโกลบิน (*gamma^G-globin, HBG2*), ยีนเอแกมมาโกลบิน (*gamma^A-globin, HBG1*), ยีนเดลตาโกลบิน (*delta-globin, HBD*) และยีนบีตาโกลบิน (*beta-globin, HBB*) (Stamatoyannopoulos, 2005; Thein, 2018)

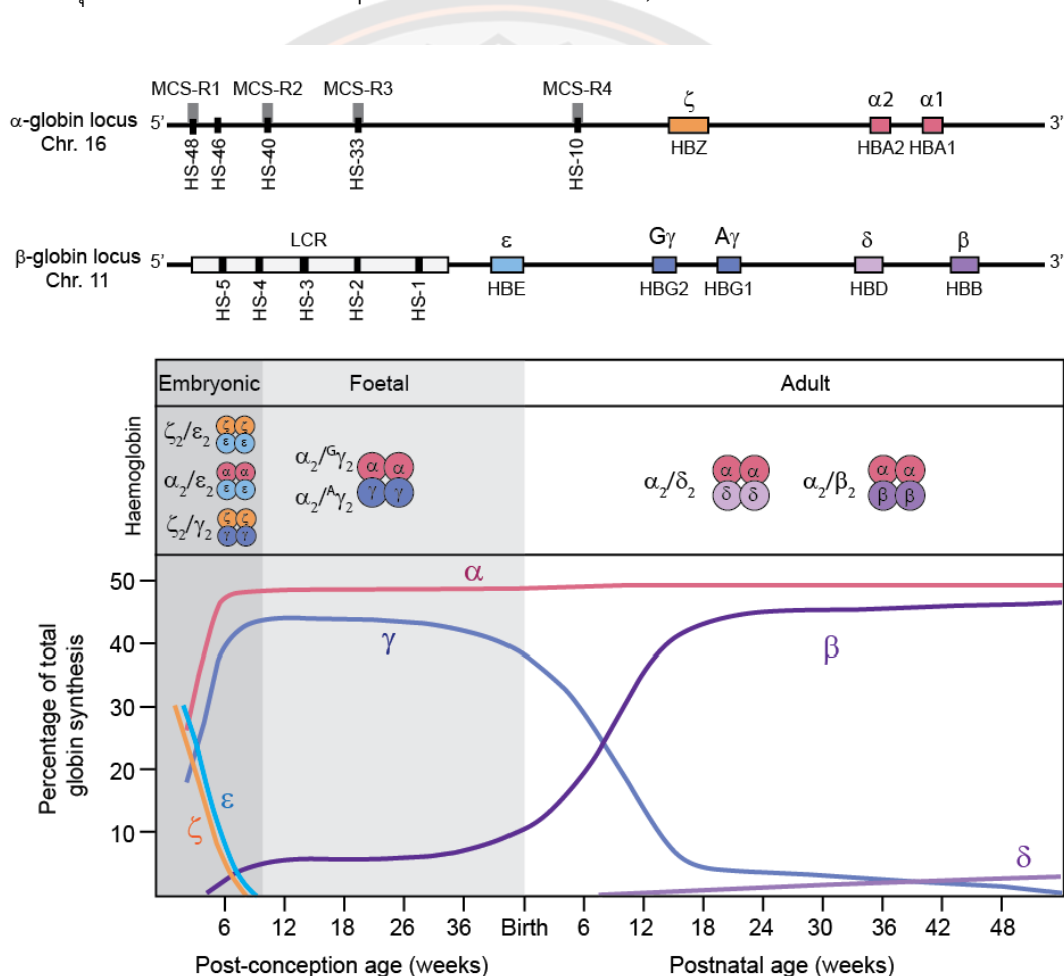
ลำดับการสร้างฮีโมโกลบินในมนุษย์พบว่า มีการสลับเปลี่ยนแปลง (*hemoglobin switching*) ไปตามแต่ละระยะของการพัฒนาการ ที่สำคัญ 2 ช่วงของการเจริญเติบโต คือ

1. ช่วงจากระยะเอ็มบริโอ (*embryo*) เข้าสู่ระยะฟetus (*fetus*) โดยในระยะเอ็มบริโอ นับตั้งแต่หลังการเกิดปฏิสนธิไปจนถึงอายุครรภ์ 8 สัปดาห์ ยีนซีตาโกลบิน, ยีนแอลฟาโกลบิน, ยีนเอปไซลอนโกลบิน และยีนแกมมาโกลบิน จะมีการแสดงออกในช่วงแรกทำให้เกิดเป็นเอ็มบริโอนิกฮีโมโกลบิน (*embryonic hemoglobin*) 3 ชนิด ได้แก่ ฮีโมโกลบิน Gower 1 (ประกอบไปด้วย ซีตาโกลบิน 2 สาย และเอปไซลอนโกลบิน 2 สาย) ฮีโมโกลบิน Gower 2 (ประกอบไปด้วยแอลฟาโกลบิน 2 สาย และเอปไซลอนโกลบิน 2 สาย) และฮีโมโกลบิน Portland (ประกอบไปด้วย ซีตาโกลบิน 2 สาย และเอปไซลอนโกลบิน 2 สาย) เมื่อเข้าสู่ระยะฟetus ตั้งแต่ช่วงอายุครรภ์ 8-35 สัปดาห์ ยีนแอลฟาโกลบิน และยีนแกมมาโกลบินจะมีระดับการแสดงออกที่สูงมาก ทำให้เกิดเป็นฮีโมโกลบินเอฟ (*Hb F*) ซึ่งพบประมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด

2. ช่วงจากระยะฟetus (*fetus*) จนกระทั่งหลังคลอด (*postnatal*) ยีนบีตาโกลบิน เริ่มมีการแสดงออกที่สูงขึ้น ในขณะที่ยีนแอลฟาโกลบินยังคงแสดงออกสูงทุกช่วงระยะของการเจริญเติบโต จึงเริ่มมีการสร้างฮีโมโกลบินเอ (*Hb A*) ในปริมาณเล็กน้อย แต่ยีนแกมมาโกลบินยังคงมีระดับการแสดงออกอยู่ ดังนั้นในทารกแรกเกิดจะตรวจพบว่า มีปริมาณฮีโมโกลบินเอฟเป็นส่วนมาก คิดเป็น 61-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทารกมีอายุได้ 6 เดือน ปริมาณฮีโมโกลบินเอฟจะลดลงเหลือประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากระดับการแสดงออกของยีนแกมมาโกลบินลดลง และยังคงลดลงอย่างต่อเนื่องจนทำให้เหลือเท่ากับผู้ใหญ่ เมื่ออายุได้ 1 ปี เป็นต้นไป จะมีปริมาณฮีโมโกลบินเอฟน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์

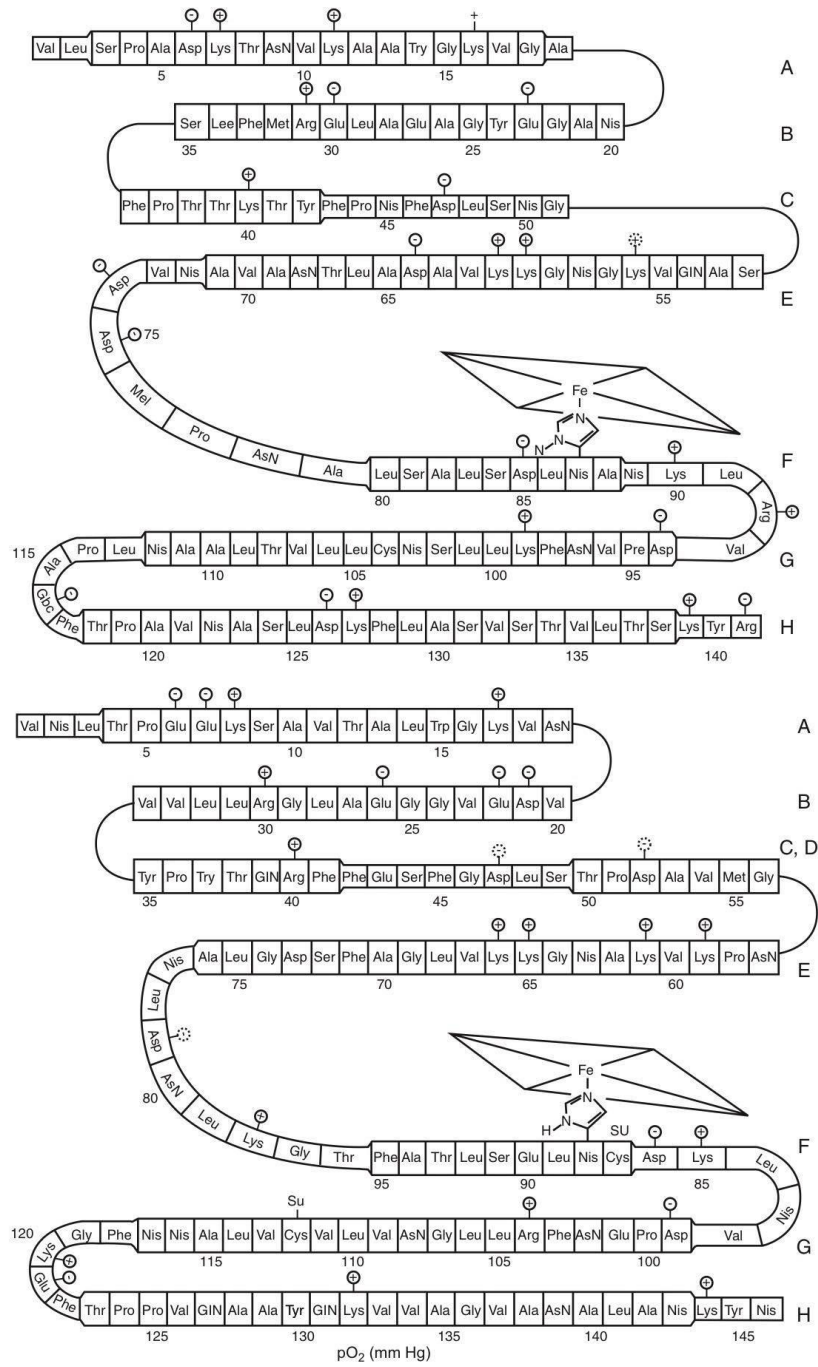
และมีปริมาณฮีโมโกลบินเอเป็นส่วนใหญ่ประมาณ 97 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนเดตาโกลบินเล็กน้อย ทำให้พบปริมาณของฮีโมโกลบินเอ 2 (Hb A₂) ประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ (Martyn, Quinlan, & Crossley, 2017) ดังภาพ 1 และแสดงโครงสร้างของโกลบินโปรตีน ดังภาพ 2

ความผิดปกติของยีนโกลบินสามารถเกิดขึ้นได้หลากหลายชนิด ทั้งความผิดปกติในด้านปริมาณ (quantitative defect) และด้านคุณภาพ (qualitative defect) ทำให้การสังเคราะห์สายโกลบินโปรตีนมีจำนวนลดลงไม่จนถึงไม่ผลิตเลย หรือทำให้ลำดับกรดอะมิโนแตกต่างไปจากเดิม ทำให้มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลง (Viprakasit & Ekwattanakit, 2018)



ภาพ 1 กลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน, บีตาโกลบิน และระดับการแสดงออกของยีนโกลบิน ที่สังเคราะห์ฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ในระยะของการพัฒนาการต่างๆ

ที่มา: Martyn et al. (2017)



ภาพ 2 โครงสร้างแบบปฐมภูมิ และทุติยภูมิ พร้อมลำดับกรดอะมิโนของโกลบินของโปรตีนแอลฟาโกลบิน (บน) และบีตาโกลบิน (ล่าง)

ที่มา: Old and Henderson (2010)

โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia)

โรคธาลัสซีเมียเป็นหนึ่งในโรคโลหิตจางชนิดที่เกิดจากความผิดปกติของยีนเดี่ยว (monogenic disorder) ที่พบได้บ่อยที่สุดในโลก เกิดจากความผิดปกติของยีนที่สังเคราะห์สายโพรตีนโกลบิน (globin chain) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของฮีโมโกลบินภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง ข้อมูลปัจจุบันพบว่าประชากรทั่วโลกกว่า 270 ล้านคน เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดใดชนิดหนึ่ง และประมาณ 500,000 คน ของเด็กแรกเกิดในแต่ละปี เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ปัจจุบันได้มีการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยพบว่า ประชากร อย่างน้อย 30–40 เปอร์เซ็นต์ เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมีย และอย่างน้อย 1 เปอร์เซ็นต์ ป่วยเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จึงกล่าวได้ว่าโรคธาลัสซีเมียยังคงมีความชุกสูงทั้งในภูมิภาคหลายแห่งของโลกรวมถึงในประเทศไทย และเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยอีกด้วย (Kulaphisit et al., 2017; Lithanatudom et al., 2016)

อาการทางคลินิกของโรคธาลัสซีเมียมีความหลากหลาย ตั้งแต่พบเม็ดเลือดแดงขนาดเล็ก โดยที่ไม่มีอาการปรากฏ หรืออาจพบว่ามีอาการซีดจนต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือด (blood transfusion) ไปจนถึงอาการรุนแรงจนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตตั้งแต่ยังเป็นทารกอยู่ในครรภ์ การจัดจำแนกชนิด (classification) ของโรคธาลัสซีเมียสามารถแบ่งได้หลากหลาย เช่น การแบ่งตามลักษณะทางพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ (genotype classification) โดยขึ้นอยู่กับชนิดของสายโกลบินโพรตีนที่ลดลง สามารถแบ่งออกเป็น

1. แอลฟาธาลัสซีเมีย (alpha thalassemia) เกิดจากการกลายพันธุ์ในกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินบนโครโมโซมแท่งที่ 16 ปัจจุบันพบการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดแอลฟาธาลัสซีเมีย มากกว่า 80 ชนิด ซึ่งส่วนมากเกิดจากการขาดหายไปขนาดใหญ่ของยีน (deletion thalassemia) แบ่งเป็นการขาดหายไปทั้งยีนทำให้ไม่มีการสังเคราะห์สายโกลบินโพรตีนในกลุ่มแอลฟา เรียกว่า แอลฟาซีโรธาลัสซีเมีย (α^0 thalassemia) ชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ Southeast Asia deletion ($-\text{SEA}$) และ Thai deletion ($-\text{THAI}$) ส่วนการขาดหายไปบางส่วนของยีนทำให้มีการสังเคราะห์สายแอลฟาโกลบินโพรตีนได้ลดน้อยลง เรียกว่า แอลฟาลัสธาลัสซีเมีย (α^+ thalassemia) ชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ -3.7 kb deletion และ -4.2 kb deletion นอกจากนี้การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการขาดหายไปของยีน (non-deletional thalassemia) บางชนิดก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่รุนแรงมากหากเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับโรคธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะชนิดที่เกิดจากการขาดหายไปของยีน (deletion thalassemia) จะก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า Non-deletional Hb H disease ที่มีความรุนแรงได้ (Lithanatudom et al., 2016)

2. บีตาธาลัสซีเมีย (beta thalassemia) เกิดจากการกลายพันธุ์ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินบนโครโมโซมแท่งที่ 11 การกลายพันธุ์มีรายงานว่าพบได้มากกว่า 200 ชนิด ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (point mutation) หรือมีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ (small deletion or small insertion) หากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นทำให้ไม่มีการสังเคราะห์สายโกลบินโปรตีนในกลุ่มบีตา เรียกว่า บีตาซีโรธาลัสซีเมีย (beta⁰ thalassemia) ชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ codon 17, IVS-1, codon 35, codon 41, codon 41/42 และ Codon 71/72 เป็นต้น การกลายพันธุ์ที่ทำให้มีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินโปรตีนได้ลดน้อยลงเรียกว่า บีตาพลัสธาลัสซีเมีย (beta⁺ thalassemia) ชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ได้แก่ IVS-5, IVSII-654 และ codon 126 เป็นต้น (Chaibunruang et al., 2018; Thein, 2018)

การจัดจำแนกชนิดของโรคธาลัสซีเมียยังสามารถจำแนกตามความรุนแรงของอาการทางคลินิก (clinical classification) แบ่งเป็น ธาลัสซีเมียเมเจอร์ (thalassemia major), ธาลัสซีเมียเมียอินเตอร์มีเดีย (thalassemia intermedia) และธาลัสซีเมียไมเนอร์ (thalassemia minor) ซึ่งมีลักษณะความรุนแรงของอาการจากมากไปน้อยตามลำดับ ปัจจุบันสมาพันธ์โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียนานาชาติ (Thalassemia International Federation; TIF) ได้มีการจำแนกชนิดของโรคธาลัสซีเมียตามแนวทาง และวิธีในการรักษาผู้ป่วยเป็นหลักเกณฑ์ (clinical management and complication) แบ่งออกเป็น

1. Transfusion-dependent thalassemia (TDT) คือ กลุ่มโรคธาลัสซีเมียชนิดที่ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือด (blood transfusion) เพื่อให้ผู้ป่วยรอดชีวิต ประกอบไปด้วย Homozygous beta⁰-thalassemia, Hb E/ beta⁰-thalassemia, Non-deletional Hb H disease และ Survived Hb Bart's hydrops fetalis ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอาการซีดรุนแรง (severe anemia) ตับ และม้ามโต (hepatosplenomegaly) จำเป็นต้องได้รับการให้เลือดและยาขับเหล็ก (iron chelation) รวมไปถึงการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการรักษา (stem cell transplantation) (Cappellini, Cohen, Porter, Taher, & Viprakasit, 2014; Viprakasit & Ekwattanakit, 2018)

2. Non-transfusion-dependent thalassemia (NTDT) เป็นกลุ่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ไม่จำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือด (blood transfusion) แต่อาจมีความจำเป็นที่จะต้องรักษาด้วยการให้เลือดบ้างเป็นครั้งคราว เช่น เกิดภาวะติดเชื้อ (infection) ภาวะตั้งครรภ์ หรือพบว่ามีภาวะม้ามโต (splenomegaly) ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอาการที่หลากหลายตั้งแต่ซีดปานกลางไปถึงรุนแรง สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Homozygous beta⁺-thalassemia, Hb E/ beta⁺-thalassemia และ Hb H disease ซึ่งการรักษาจะมุ่งเน้นเพื่อการประคับประคองอาการ บางกรณีอาจมีการ

ให้เลือด การตัดม้าม การให้ยากระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินเอฟ และยาขับเหล็ก เป็นต้น (Taher, Vichinsky, Musallam, Cappellini, & Viprakasit, 2013; Viprakasit & Ekwattanakit, 2018)

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing and Quantitation)

การตรวจวิเคราะห์ชนิด และปริมาณฮีโมโกลบินเป็นการตรวจ เพื่อวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติ โดยถือเป็นการตรวจวินิจฉัยที่สำคัญที่สุดอีกวิธีหนึ่ง ทั้งในการยืนยันผลการคัดกรองหาผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง การตรวจชนิดนี้ อาศัยหลักการของโปรตีนแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการเคลื่อนที่แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล และประจุสุทธิภายในโปรตีน โดยฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะมีประจุสุทธิทางไฟฟ้าที่แตกต่างกัน จึงสามารถนำมาแยกชนิดได้ ในปัจจุบันนิยมใช้เครื่องมืออัตโนมัติมาช่วยในการวิเคราะห์ เนื่องจากมีความสะดวกและมีความแม่นยำสูง โดยอาศัยหลักการสำคัญ คือ

1. หลักการคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography)

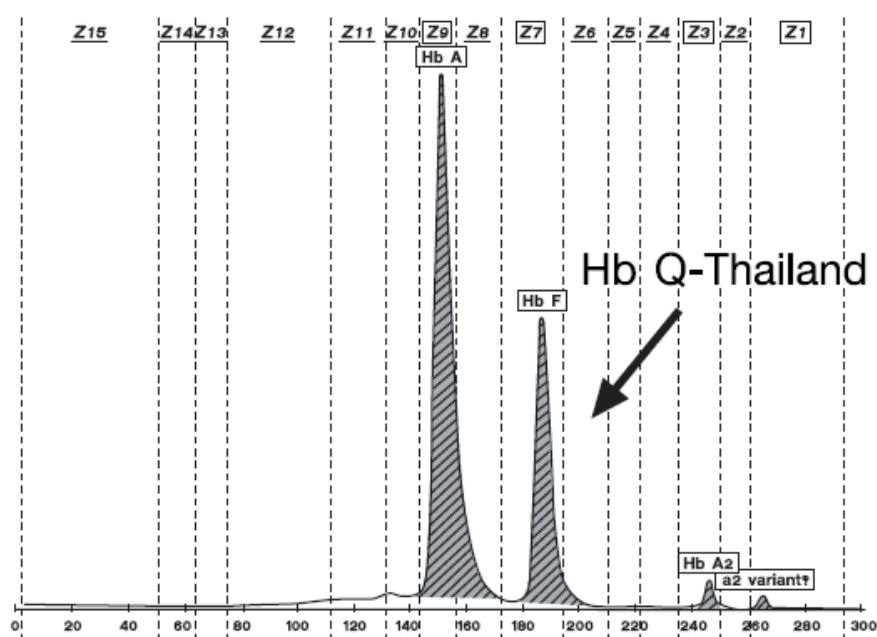
ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะถูกแยกในหลอดคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) โดยจะเกิดการแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange chromatography) เกิดขึ้นภายในคอลัมน์ (column) ที่บรรจุตัวกลางที่มีคุณสมบัติเป็นประจุลบ เช่น เรซิน (resin) หลังจากนั้นจะถูกสารละลายที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกที่เพิ่มความเข้มข้น ทำหน้าที่ชะพาออกมาจากคอลัมน์ โดยจะจำแนกชนิดของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดตามเวลาที่ถูกจับไว้ในคอลัมน์ เรียกว่า Retention time (RT) และทำการเปรียบเทียบชนิดฮีโมโกลบินกับค่า RT ของฮีโมโกลบินมาตรฐาน จากนั้นวัดปริมาณฮีโมโกลบิน โดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 และ 690 นาโนเมตร การรายงานชนิด และปริมาณฮีโมโกลบิน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซึ่งคำนวณจากตามพื้นที่ใต้กราฟ และแสดงผลในรูปของโครมาโตแกรม (chromatogram) ซึ่งหลักการนี้ มีทั้งแบบแรงดันสูง (high pressure liquid chromatography; HPLC) และแบบแรงดันต่ำ (low pressure liquid chromatography; LPLC)

2. หลักการแยกฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก (capillary electrophoresis; CE)

การแยกสารในหลอดขนาดเล็กโดยอาศัยคุณสมบัติทางไฟฟ้าของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดที่แตกต่างกันไป โดยจะใช้หลอด capillary ขนาดเล็กที่ภายในเคลือบด้วยสารซิลิกา (silica) และแช่ปลายทั้งสองข้างในสารละลาย electrolyte และปลายทั้งสองข้างต่อเข้ากับไฟฟ้าความต่างศักย์สูง เมื่อฉีดตัวอย่างเลือดเข้าไปในหลอดขนาดเล็กจะเกิดการแตกตัวเป็นไอออน (ion) เกิดการเคลื่อนที่จากขั้วบวกไปยังขั้วลบโดยอาศัยแรงผลักทางไฟฟ้า และทำการตรวจวัดที่ปลายขั้วลบ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ และคำนวณปริมาณของฮีโมโกลบินออกมาเรียกว่า Electropherogram โดยวิธีนี้จะมีศักยภาพในการแยกตำแหน่ง

ของฮีโมโกลบินเอ 2 ออกจากฮีโมโกลบินอี (คณะกรรมการการจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ, 2556)

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติได้โดยอาจจะปรากฏในบริเวณที่เรียกว่าวินโดว (window) หรือซ้อนทับกับตำแหน่งของฮีโมโกลบินชนิดอื่น ณ ค่า RT ต่างๆ ในกรณีที่ใช้การตรวจด้วยเครื่อง HPLC และ LPLC พบว่าฮีโมโกลบินหลายชนิดมีค่า RT ที่ใกล้เคียงกันมาก จึงไม่สามารถวินิจฉัยได้อย่างชัดเจน จำเป็นต้องได้รับการตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอจึงจะทราบถึงชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติได้ นอกจากนี้การวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง CE จะแสดงผลฮีโมโกลบินผิดปกติบางชนิดในตำแหน่งที่ทับซ้อนกันได้ เช่น Hb Q-Thailand และ Hb Tak จะปรากฏในตำแหน่งเดียวกับ ฮีโมโกลบินเอฟ ดังภาพ 3 จึงจำเป็นต้องได้รับการยืนยันด้วยการวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอด้วยเช่นกัน (คณะกรรมการการจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ, 2556)



Hemoglobin Electrophoresis

ภาพ 3 การวิเคราะห์ Hb Q-Thailand ปรากฏในตำแหน่งเดียวกับฮีโมโกลบินเอฟ
จากการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเทคนิค Capillary electrophoresis

ที่มา: คณะกรรมการการจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ (2556)

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา (alpha hemoglobin variants)

ฮีโมโกลบินผิดปกติ (hemoglobin variant or abnormal hemoglobin) จัดเป็นหนึ่งในความผิดปกติทางพันธุกรรมอันก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพที่พบได้บ่อย (Daniel et al., 2005) สาเหตุเกิดได้จากการกลายพันธุ์ทั้งในกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน และกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (Shih et al., 2010) จากการศึกษาค้นพบว่า ประชากรทั่วโลกมากกว่า 7 เปอร์เซ็นต์ มีความผิดปกติของยีนโกลบินแอบแฝงอยู่ (Forget et al., 2001) และประมาณ 150 ล้านคน ทั่วโลกตรวจพบว่า มีฮีโมโกลบินผิดปกติ (Shimizu et al., 2006) นอกจากนี้มีการรายงานการตรวจพบ และระบุชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติไปแล้วมากกว่า 1,300 ชนิดทั่วโลก และเกือบ 500 ชนิด ของฮีโมโกลบินผิดปกติเกิดขึ้นในยีนแอลฟาโกลบิน 2 (*HBA2*) และยีนแอลฟาโกลบิน 1 (*HBA1*) (Shih et al., 2010)

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ส่วนใหญ่เกิดจากความผิดปกติชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (point mutation) (Clarke and Higgins, 2000) และสามารถเกิดได้หลายตำแหน่งในทุกระดับของกระบวนการสังเคราะห์สายแอลฟาโกลบินโปรตีน ได้แก่

1. ขั้นตอนการสังเคราะห์สายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA processing) ซึ่งพบได้ที่ตำแหน่ง IVS-1 donor site, IVS-1 acceptor site และ Poly (A) signal site
2. ขั้นตอนการถอดรหัสกรดอะมิโนจากสายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA translation) พบที่ตำแหน่ง Initiation codon, Exon1-3 และ Termination codon
3. ขั้นตอนหลังการถอดรหัสกรดอะมิโนจากสายเอ็มอาร์เอ็นเอ (post-translation) จึงทำให้พบความหลากหลายของชนิดการกลายพันธุ์ในฮีโมโกลบินที่ผิดปกติชนิดแอลฟา

ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาชนิดที่พบในประเทศไทย

Hb Constant Spring (Hb CS) เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Termination codon ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 (*alpha-globin 2, HBA2*) เกิดเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก TAA เป็น CAA ส่งผลให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนในสายแอลฟาโกลบินที่ยาวขึ้นไป (elongation) อีกจำนวน 31 ตัว

Hb Pakse' เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง termination codon ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 (*alpha-globin 2, HBA2*) เช่นเดียวกับ Hb CS แต่แตกต่างที่ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก TAA เป็น TAT ส่งผลให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนในสายแอลฟาโกลบินที่ยาวขึ้นไปอีกจำนวน 31 ตัว เช่นกัน

Hb CS และ Hb Pakse' จัดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติและแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการขาดหายไปของยีนที่สำคัญ สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับแอลฟาซีโรธาลัสซีเมีย (α^0 thalassemia) ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า Non-deletional Hb H disease ที่มีความรุนแรง นอกจากนี้มีรายงานพบว่า ผู้ที่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Hb Constant Spring เมื่อนำมาทำการตรวจสอบด้วยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) พบว่าเป็น Hb Pakse' 5-7 เปอร์เซ็นต์

(Pichanun et al., 2010; Sanchaisuriya, Fucharoen, & Fucharoen, 2002; Singsanan, Fucharoen, Savongsy, Sanchaisuriya, & Fucharoen, 2007; Viprakasit et al., 2002)

Hb Q-Thailand เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Codon 74 ของยีนแอลฟาโกลบิน 1 (*HBA1*) พบว่า มีความสัมพันธ์กับยีนแอลฟาพลัสธาลัสซีเมีย (α^+ thalassemia) ชนิด -4.2 kb deletion บนโครโมโซมข้างเดียวกันเสมอ Hb Q-Thailand พบว่ามีความชุกสูงในคนไทย สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับแอลฟาซีโรธาลัสซีเมีย ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า Hb H-Q disease (Leung, Ma, Chan, & Chan, 2004)

Hb Hekinan เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Codon 27 ของยีนแอลฟาโกลบิน 1 (*HBA1*) จัดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกสามารถพบ Hb Hekinan ร่วมกับฮีโมโกลบินอี (Hb E) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และ LPLC จะปรากฏที่ตำแหน่งเดียวกับ Hb A จึงอาจทำให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาดได้ (คณะกรรมการการจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ, 2556)

Hb Quong Sze เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 125 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 (*HBA2*) สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับแอลฟาซีโรธาลัสซีเมีย ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า Hb H-QZ disease ที่มีความรุนแรงได้ (Laosombat, Wiryasateinkul, Chrangtrakul, & Fucharoen, 2003; Suwannasing, Sroy mora, & Jindadamrongwech, 2016)

Hb Nakhon Ratchasima เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Codon 63 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 (*alpha-globin 2, HBA2*) สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับฮีโมโกลบินอี และยีนแอลฟาพลัสธาลัสซีเมีย (α^+ thalassemia) ชนิด -3.7 kb deletion (Sivorakun, Fucharoen, Puangplruk, Kheawon, & Fucharoen, 2011)

จากการศึกษาพบว่า ยังมีการรายงานฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบได้น้อยในประเทศไทยอีกหลายชนิดที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย, บีตาธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอีทำให้ผู้ป่วยมีอาการที่หลากหลายตั้งแต่ซีดปานกลางไปจนถึงรุนแรงจนต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือด ซึ่งสามารถสรุป ตำแหน่งของยีน และรูปแบบการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาต่างๆ ในตาราง 1

ตาราง 1 ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาต่างๆ ที่มีการรายงานพบในประเทศไทย

ยีนที่ศึกษา	ตำแหน่ง	ฮีโมโกลบินผิดปกติ	รูปแบบการกลายพันธุ์
HBA2		Initiation codon	(HBA2: c.1delA; Met>0)
		deletion A	(Viprakasit et al., 2014)
		Initiation codon	(HBA2: c.2delT; Met>0)
		deletion T	(Suwannasing et al., 2016)
	Exon 1	Hb Anantharaj	(HBA2: c.11AAG>CAG; α 11(A9)
		(Hb J Wuming)	Lys>Gln) (Zhai et al., 2012)
		Hb Siam	(HBA2: c.15GGT>CGT; α 15 (A13)
		(Hb Ottawa)	Gly>Arg) (Turbpaiboon et al., 2002)
		Codon 30 deletion	(HBA2: c.91_93delGAG; α 30 (B11)
			Glu>0) (Suwannasing et al., 2016)
	Exon 2	Hb Nakhon	(HBA2: c.63 GCC>GTC; α 63(E12)
		Ratchasima	Ala>Val) (Srivorakun et al., 2011)
		Hb Suan Dok	(HBA2: c.109CTG>CGG; α 109 (G16)
			Leu>Arg) (Regtuijt et al., 2004)
	Hb Quong Sze	(HBA2: c.377T>C; α 125(H8)	
		Leu>Pro) (Suwannasing et al., 2016)	
Exon 3	Hb Westmead	(HBA2: c.369CAC>CAG; α 122(H5)	
		His>Gln) (Viprakasit et al., 2014)	
	Hb Constant Spring	(HBA2: c.427T>C; α 142 Stop>Gln)	
		(Pichanun et al., 2010)	
	Hb Pakse'	(HBA2: c.429A>T; α 142 Stop>Tyr)	
		(Pichanun et al., 2010)	

ตาราง 1 ต่อ

ยีนที่ศึกษา	ตำแหน่ง	ฮีโมโกลบินผิดปกติ	รูปแบบการกลายพันธุ์
<i>HBA1</i>	Exon1	Hb Anantharaj (Hb J Wuming)	(HBA1: c.11AAG>CAG; α 11(A9) Lys>Gln) (Zhai et al., 2012)
		Hb Siam (Hb Ottawa) more	(HBA1: c.15GGT>CGT; α 15 (A13) Gly>Arg) (Turbpaiboon et al., 2002)
		Hb Hekinan	(HBA1: c.27GAG>GAT; α 27 (B8) Glu>Asp) (Ngiwsara et al., 2004)
		Intron 1	Donor splice site mutation at IVSI-I
	Exon2	Hb Queens Park	(HBA1: c.98T>A; α 32 (B13) Met>Lys) (Viprakasit et al., 2014)
		Hb Queens	(HBA1: c.34CTG>CGG; α 34 (B15) Leu>Arg) (Fucharoen et al., 2007)
		Hb Q-Thailand	(HBA1: c. 74GAC>CAC; α 74 Asp>His) (Leung et al., 2004)
		Hb Thailand	(HBA1: c.170AAG>ACG; α 56 (E5) Lys>Thr) (Singha et al., 2013)
	Exon 3	Hb Phnom Penh	(HBA1: c.117/118+ATC; α 117(GH5)-Ile- α 118(H1) (Singha et al., 2013)
		Hb Pak Num Po	(HBA1: c.396_397insT+35) (Viprakasit et al., 2004)

ข้อมูลทางด้านระบาดวิทยา ในประเทศไทยพบว่า ความชุกของฮีโมโกลบินที่ผิดปกติชนิดแอลฟาที่ทำการศึกษาในเขตภาคเหนือ ช่วงปี 2012-2014 มีรายงานว่าพบ Hb Q-Thailand (19.0%), Hb Hekinan (3.8%), Hb Siam (0.9%), Hb Beijing (0.5%) และ Hb Kawachi (0.5%) จากตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบจำนวน 211 ตัวอย่าง (Panyasai, Fucharoen, & Fucharoen, 2016) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาจากหลายภูมิภาคในประเทศไทยตั้งแต่ช่วงปี 2002-2012 มีรายงานพบ Hb Q-Thailand (15.8%), Hb Siam (1.2%), Hb Queens (0.9%), Hb Beijing (0.8%), Hb Hekinan (0.8%) และ Hb Nakhon Ratchasima (0.8%) (Srivorakun, Singha, Fucharoen, Sanchaisuriya, & Fucharoen, 2014) จากข้อมูลเบื้องต้นจึงเป็นตัวกำหนดการตรวจวิเคราะห์ ให้ครอบคลุมชนิดของฮีโมโกลบินที่ผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบได้ในประเทศไทย

การตรวจวินิจฉัยทางด้านชีววิทยาโมเลกุล (molecular diagnosis) การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา มีความยุ่งยากมากกว่าการตรวจฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดบีตา เนื่องจากยีนแอลฟาโกลบินจัดเป็นยีนที่มีการจำลองตัวเอง (gene duplication) จึงทำให้บริเวณดังกล่าวมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกันมาก (homology region) พบความแตกต่างกันในบริเวณ Intron 2 และ 3' untranslated จึงทำให้แยกความแตกต่างระหว่างยีนทั้ง 2 ได้ยาก นอกจากนี้ยีนแอลฟาโกลบินยังมีสัดส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ชนิดกวานีน (guanine, G) และ ไซโตซีน (cytosine, C) ในปริมาณสูง (high GC content) ถึง 60-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับยีนบีตาโกลบินที่พบเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเกิดโครงสร้างแบบทุติยภูมิ (secondary structure) ของสายดีเอ็นเอได้ง่าย และสามารถขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ (polymerase chain reaction, PCR) (Fischel-Ghodsian, Nicholls, & Higgs, 1987; Somerville, 2001; Uprasert, Settapiboon, Amornsiriwat, Sutcharitchan, & Rojnuckarin, 2017; Viprakasit et al., 2002)

ในปัจจุบันมีรายงานการใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา เช่น เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยอาศัยหลักการกลายพันธุ์บางตำแหน่ง เช่น Hb Constant Spring, Hb Pakse' และ Hb Quong Sze ซึ่งตำแหน่งการกลายพันธุ์เกิดบริเวณที่เป็นจุดตัดจำเพาะ (restriction site) ทำให้การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าว ส่งผลให้การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เกิดเปลี่ยนแปลงไป จึงได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัด (restriction fragment) มีความยาวที่แตกต่างกัน และใช้เป็นจุดสังเกตในการตรวจสอบ แต่อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ของยีนส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดบริเวณที่เป็นจุดตัดจำเพาะ ทำให้เทคนิคนี้ใช้ตรวจวิเคราะห์ได้อย่างจำกัด นอกจากนี้มีการรายงานการใช้เทคนิค Amplification refractory mutation system-PCR (ARMS) และการตรวจหาลำดับ

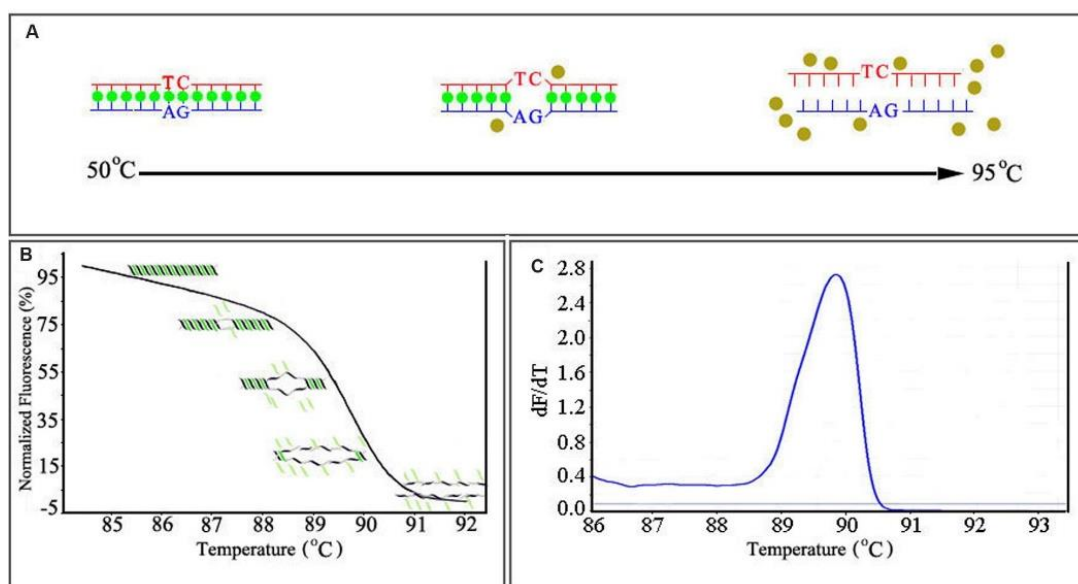
นิวคลีโอไทด์ของยีนโกลบินโดยตรง (DNA sequencing) มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะต่อการตรวจวิเคราะห์กับตัวอย่างที่มีจำนวนมาก (Sura et al., 2007)

เทคนิค High resolution melting (HRM) analysis

HRM analysis เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความสำคัญต่อการตรวจหาการกลายพันธุ์ เป็นเทคนิคที่ทำในระบบปิด และสามารถทำการวิเคราะห์ร่วมกับวิธี Real-time PCR ได้ และเริ่มใช้กันอย่างแพร่หลาย จึงถือว่ามีความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ (Shih et al., 2010)

หลักการสำคัญของเทคนิค HRM analysis อาศัยคุณสมบัติของสีเรืองแสงประเภทอิ่มตัว (saturating dye) ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ และเครื่องวัดสัญญาณรวมไปถึงโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ที่มีความไวในการตรวจจับ การเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิหลังการทำ PCR อย่างรวดเร็วในอัตรา 0.1-0.3 องศาเซลเซียส/วินาที จนใกล้ถึงช่วงของอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, T_m) ของดีเอ็นเอจะเริ่มเกิดการแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ทำให้สีเรืองแสงที่เกาะอยู่หลุดออกอย่างเฉียบพลัน จึงเกิดการลดลงของการเรืองแสง เครื่องวัดสัญญาณหรือโปรแกรมจะทำการวัด และนำข้อมูลจากค่าความเข้มของการเรืองแสงกับอุณหภูมิที่ได้มาสร้างเส้นกราฟที่เรียกว่า Melting curve ดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน จะให้รูปแบบของ Melting curve ที่แตกต่างกันซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่างๆ ดังภาพ 4

มีการประยุกต์ใช้เทคนิค HRM analysis ในการตรวจหาการกลายพันธุ์และการผันแปรในลำดับนิวคลีโอไทด์ (scanning of mutation and sequence variants) ของยีนอย่างแพร่หลาย เช่น การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *c-kit* ใน gastrointestinal stroma tumors (GIST) (Willmore et al., 2004), platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) (Holden, Willmore-Payne, Coppola, Garrett, & Layfield, 2007), ยีน epidermal growth factor receptor (*EGFR*) (Smith, Chadwick, Willmore-Payne, & Bentz, 2008) เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าเทคนิค HRM analysis มีความนิยมอย่างมากในการนำมาประยุกต์ในการตรวจวิเคราะห์ยีนอย่างหลากหลาย



ภาพ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิ และการลดลงของสารเรืองแสง ในดีเอ็นเอสายคู่

ที่มา: Sun, Li, Xiong, Zhao, and Chen (2016)

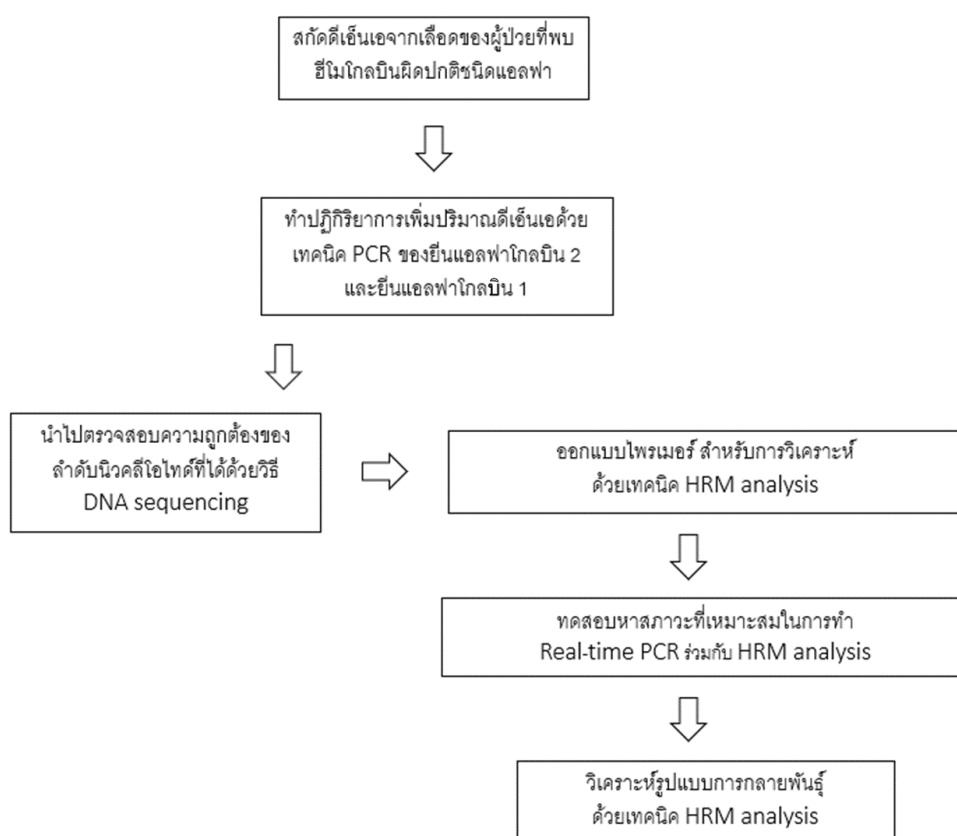
เมื่อทำการเปรียบเทียบเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis กับเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Amplification refractory mutation system-PCR (ARMS) และ DNA sequencing ที่ต่างมีขั้นตอนที่ซับซ้อนและมีกระบวนการอย่างอื่นเพิ่มเติมก่อนการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งเป็นการเพิ่มความยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาที่นาน รวมถึงความเสี่ยงในการก่อให้เกิดการปนเปื้อนในการวิเคราะห์ผล แต่การทำเทคนิค HRM analysis สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้เลย โดยไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการอื่นเพิ่มเติมหลังการวิเคราะห์ โดยทั่วไปในการวิเคราะห์นี้ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์รวดเร็ว โดยใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ 0.1-0.3 องศาเซลเซียส/วินาที และสามารถเสร็จสิ้นการวิเคราะห์ภายใน 1-5 นาที ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis จัดเป็นวิธีการที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมไม่ว่าการตรวจหารูปแบบพันธุกรรมอย่างสลับ (single nucleotide polymorphism; SNPs) หรือการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (point mutation) รวมถึงการกราดตรวจการกลายพันธุ์ และการแปรผันในลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis จัดเป็นวิธีที่สะดวก ง่าย รวดเร็ว มีความยืดหยุ่นในการประยุกต์ใช้ ค่าใช้จ่ายถูก และที่สำคัญมีความถูกต้องแม่นยำสูงเทียบเท่าหรือสูงกว่าวิธีอื่น

ปัจจุบันมีรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis สำหรับการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ในประเทศได้วันมีรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ Hb Hekinann, Hb Ottawa, Hb G-Taichung, Hb Phonom Penh, Hb Westmead, Hb Owari, Hb Constant Spring และ Hb Quong Sze (Shih et al., 2010) ในประเทศไทยมีรายงานการใช้เทคนิค HRM analysis สำหรับการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของ Hb J-Buda, Hb G-Waimanalo Hb Q-India และ Hb Q-Thailand (Yimniam & Jindadamrongwech, 2016) และมีการใช้เทคนิค HRM analysis ในการตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดที่พบไม่บ่อยในยีนแอลฟาโกลบินที่ก่อให้เกิดโรค Hb H disease ชนิดรุนแรงในประเทศไทยจำนวน 6 ชนิด (initiation codon del A, initiation codon del T, *HBA2* codon 30 deletion, Hb Quong Sze, donor splice site mutation at IVSI-I และ Hb Queens Park) (Suwannasing et al., 2016) แต่จากงานวิจัยที่กล่าวมานั้น เป็นการศึกษาในเฉพาะบางตำแหน่งของยีนไม่ได้ครอบคลุมทุกตำแหน่งภายในยีน มีรายงานในการใช้เทคนิค HRM analysis ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนบีตาโกลบิน (*HBB*) โดยได้พัฒนาการวิเคราะห์ให้ครอบคลุมบริเวณทั้งหมดของยีน สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดหายาก และชนิดใหม่ในกลุ่มพาหะบีตาธาลัสซีเมีย (Laochinchat & Jindadamrongwech, 2017) จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิค HRM analysis สำหรับการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ให้ครอบคลุมทั้งชนิดที่พบได้บ่อย และชนิดใหม่ที่อาจพบได้ในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์กลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่มีการตรวจพบได้ในประเทศไทย จึงทำการดำเนินงานวิจัยดังภาพ 5 ประกอบด้วย การเก็บรวบรวมตัวอย่าง การออกแบบไพรเมอร์ รวมไปถึงการทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาในแต่ละคู่ไพรเมอร์ และยังทำการยืนยันประสิทธิภาพของเทคนิค HRM analysis กับวิธี DNA sequencing เพื่อทดสอบความถูกต้องแม่นยำในการศึกษาวิจัยครั้งนี้



ภาพ 5 แผนภาพวิธีการดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือตัวอย่างดีเอ็นเอหรือตัวอย่างเลือดของ ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยแล้วว่าพบการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา 11 ชนิด ได้แก่ Hb Constant Spring, Hb Pakse', Hb Quong Sze, Hb Q-Thailand, Hb Hekinan, Hb Anantharaj, Hb Siam, Hb Queens, Hb Nakhon Ratchasima และ Hb Thailand จากผล Hb typing ด้วยวิธี HPLC และ CE ร่วมไปถึงการตรวจยืนยันในระดับดีเอ็นเออย่าง ARMS-PCR และ DNA sequencing และทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่ไม่พบความผิดปกติ (Wild-type) โดยงานวิจัยนี้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่าง ณ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์โลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ระหว่างเดือน มกราคม 2562 ถึง ธันวาคม 2563

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา PureLink™ Genomic DNA Mini Kit จาก Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Germany) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ใช้ตัวอย่างเลือด ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Centrifuge แล้วเติมน้ำยา Proteinase K ลงไป 20 ไมโครลิตร และ RNase A 20 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมโดยใช้เครื่อง Vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เติมน้ำยา Lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมโดยใช้เครื่อง Vortex mixer อีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 95% แอลกอฮอล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer จากนั้นดูดปริมาตรของเหลวทั้งหมดใส่ในหลอด Column tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งหลอด Collection tube แล้วนำหลอด Column tube ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ แล้วเติมน้ำยา Wash buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำหลอด Column tube ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่อีกครั้ง แล้วเติมน้ำยา Wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที สุดท้ายนำหลอด Column tube ใส่ในหลอด Eppendorf อันใหม่ เติมน้ำยา Elution buffer 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ไปทำการทดสอบต่อไป หากยังไม่ได้ทำการทดสอบให้เก็บดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบ การตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ทั้งด้านปริมาณ และความบริสุทธิ์ ทดสอบโดยการนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

การทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 (HBA2) และ ยีนแอลฟาไกลบิน 1 (HBA1) และการทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์

เนื่องจากยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 จัดเป็นยีนที่มีการจำลองตัวเอง (gene duplication) จึงทำให้บริเวณดังกล่าวของทั้ง 2 ยีนมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกันมาก ในการศึกษาคั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ HBA_T1, HBA1_T2 และ HBA2_T3 (Uaprasert et al., 2017) ดังตาราง 2 ในการแยกความแตกต่าง ใช้ชุดน้ำยาสำหรับการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยชุดน้ำยา HotStarTaq DNA Polymerase จาก Qiagen (Hilden, Germany) โดยเตรียมสารละลายผสม (master mix) ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ตัวอย่าง ดีเอ็นเอ (ความเข้มข้น 10-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร), 10x PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 5x Q-Solution 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ไพรเมอร์ผสม (ทั้ง forward และ reverse) 0.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.5 ไมโครลิตร, HotStarTaq DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Germany) สภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ ดังตาราง 3 ตรวจสอบขนาด และคุณภาพของผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) นำดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการทดสอบมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา QIAquick PCR Purification Kit จาก Qiagen (Hilden, Germany) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ใช้ผลผลิต PCR ที่ได้จากการทดสอบนำมาผสมกับน้ำยา PB buffer ในอัตราส่วน 1 : 5 เท่าของปริมาตรผลผลิต PCR ที่ได้ต่อน้ำยา ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer จากนั้นดูด ปริมาตรของเหลวทั้งหมดใส่ในหลอด Column tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที นำหลอด Column tube ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ แล้วเติมน้ำยา PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที นำหลอด Column tube ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่อีกครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้แอลกอฮอล์หรือน้ำยาที่ยังตกค้าง อยู่ใน Column tube หลุดออกไปจนหมด สุดท้ายนำหลอด Column tube ใส่ในหลอด Eppendorf อันใหม่ เติมน้ำยา EB buffer 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 2 นาที และนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยวิธี DNA sequencing ที่บริษัท MacroGen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

ตาราง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1

Primers	Sequence (5' to 3')	ค่า Tm (C°)	ตำแหน่งของ primer ใน ฐานข้อมูล (NCBI)	Amplicon length (bp)
HBA T1 (F) (Uprasert et al., 2017)	GGGGTGCACGAG CCGACAG	66.0	37237-37255 (NG_000006.1)	1,600
HBA1 T2 (R) (Uprasert et al., 2017)	GTGCCTGTATCTG GGAGGTTTTACG	67.4	38850-38826 (NG_000006.1)	
HBA T1 (F) (Uprasert et al., 2017)	GGGGTGCACGAG CCGACAG	66.0	33433-33451 (NG_000006.1)	1,300
HBA2 T3 (R) (Uprasert et al., 2017)	TCTCTCAGGACAG GGGATGGTTCAG	69.1	34760 -34736 (NG_000006.1)	

ตาราง 3 สภาวะที่เหมาะสมของคู่ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1

Condition	Primers	
	HBA_T1/HBA_T2	HBA_T1/HBA_T3
Initial activation	95°C, 15 min	95°C, 15 min
Denaturation	95°C, 1 min	95°C, 1 min
Annealing	60°C, 1 min	60°C, 1 min
Extension	72°C, 1 min	72°C, 1 min
Final extension	72°C, 5 min	72°C, 5 min
Number of cycles	35	35

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis

ปัจจัยสำคัญในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ให้มีประสิทธิภาพสูงคือขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิเคราะห์ควรมีขนาดประมาณ 50-250 bp (Shih et al., 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence: NG_000006.1 (Zhang, Liu, & Liang, 2002) และทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) ให้มีขนาดตั้งแต่ 100-200 bp และครอบคลุมตำแหน่งการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ซึ่งสามารถสรุปข้อมูลของไพรเมอร์ ดังตาราง 4 และชนิดของการกลายพันธุ์ที่สามารถตรวจพบได้ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ดังภาพ 6

ตาราง 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับHRM analysis

Primers	Sequence (5' to 3')	ค่า T_m (C°)	ตำแหน่งของ primer ในฐานข้อมูล (NCBI)	Amplicon length (bp)
E1F	CTCTTCTGGTCCCCACAG	59.3	33740-33759	143
	AC		37544-37563 (NG_000006.1)	
E1R	AGGGAGCCTCACCTCTC	59.6	33882-33865	143
	C		37686-37669 (NG_000006.1)	
E12F	TCTCCTGCCGACAAGACC	64.2	33785-33804	154
	AA		37589-37608 (NG_000006.1)	
E12R	ACGGTTGAGGGTGGCCT	65.1	33939-33921	154
	GT		37743-37725 (NG_000006.1)	

ตาราง 4 ต่อ

Primers	Sequence (5' to 3')	ค่า T_m (C°)	ตำแหน่งของ primer ใน ฐานข้อมูล (NCBI)	Amplicon length (bp)
E4TF	ACGGCTCTGCCAGGTT	63.8	33740-33759	147
	AAG		37544-37563 (NG_000006.1)	
E4TR	GTCCACCCGAAGCTTGT	64.2	33740-33759	147
	GC		37544-37563 (NG_000006.1)	
CSF	TCCTAAGCCACTGCCTGC	63.9	34336-34355 (NG_000006.1)	98
CSR	TG	64.3	34493-34475 (NG_000006.1)	
EQF	GTTAAGGGCCACGGCAA	63.4	34058-34076 (NG_000006.1)	145
EQR	GA	62.5	34202-34185 (NG_000006.1)	
E5F	TCCTAAGCCACTGCCTGC	63.9	34336-34355 (NG_000006.1)	142
E5R	ACCGAGGCTCCAGCTTA	63.9	34477-34458 (NG_000006.1)	
	ACG			

การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการแบ่งการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Conventional PCR เป็นการทดสอบขั้นตอนแรก และเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับเทคนิค HRM analysis เป็นการทดสอบขั้นตอนต่อไป โดยใช้ผลผลิต (PCR product) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 ด้วยคู่ไพรเมอร์ จากตาราง 2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)

เทคนิค Conventional PCR ทำการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์ จากตาราง 4 ด้วยชุดน้ำยา Platinum™ Taq DNA Polymerase จาก Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Germany) ทำการทดสอบหาอุณหภูมิ และสถานะที่เหมาะสมในการทำเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Germany) ตรวจสอบขนาด และชิ้นส่วนของผลผลิตที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis ทำการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์จากตาราง 4 ด้วยชุดน้ำยา Platinum™ Taq DNA Polymerase จาก Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Germany) และใช้ SYTO™ 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Germany) เป็นสารเรืองแสง และทำการทดสอบหาอุณหภูมิและสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) ร่วมกับวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Precision Melt Analysis™ (Bio-Rad Laboratories)

1. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ สำหรับการตรวจวิเคราะห์กลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา

เนื่องจากค่า T_m ที่คำนวณได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละคู่ไพรเมอร์อยู่ที่ 58.4-62.5 องศาเซลเซียส จึงเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในช่วง Annealing ของการทำปฏิกิริยา PCR อยู่ที่ 58, 60, 62, 64 และ 66 องศาเซลเซียส โดยเตรียมสารละลายผสม (master mix) ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร จากชุดน้ำยา Platinum™ Taq DNA Polymerase จาก Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Germany) ประกอบด้วย 10x PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 0.75 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ผสม (ทั้ง forward และ reverse) 0.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.5 ไมโครลิตร, Platinum™ Taq DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร, ตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Germany) สภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ ดังตาราง 5 ตรวจสอบขนาด และคุณภาพของผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

และคัดเลือกเฉพาะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis ต่อไป

ตาราง 5 สภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิในช่วง Annealing ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ สำหรับการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา

Condition	Primers
Initial activation	95°C, 2 min
Denaturation	95°C, 20 sec
Annealing	58, 60, 62, 64 และ 66°C, 15 sec
Extension	72°C, 15 sec
Final extension	72°C, 5 min
Number of cycles	35

2. การทดสอบหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR สำหรับการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา

ทดสอบหาผลของ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ โดยเตรียมสารละลายผสม (master mix) ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร จากชุดน้ำยา Platinum™ Taq DNA Polymerase จาก Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Germany) ประกอบด้วย 10x PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ผสม (ทั้ง forward และ reverse) 0.5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.5 ไมโครลิตร, 50 ไมโครโมลาร์ SYTO™9 Green 1.0 ไมโครลิตร, Platinum™ Taq DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร, ตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Germany) สภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ของคู่ไพรเมอร์ EQF/EQR ดังตาราง 8 ตรวจสอบขนาด และคุณภาพของผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส และคัดเลือกเฉพาะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis ต่อไป

การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค HRM analysis

วิเคราะห์ข้อมูลจากการเปรียบเทียบของลักษณะของ Melting curve ที่ได้ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาแล้ว เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (normal control) โดยการแปลผลจากลักษณะของ Melting curve ในบางรูปแบบของการกลายพันธุ์อาจพบความแตกต่างของลักษณะของ Melting curve ได้มากกว่า 1 รูปแบบ คือ รูปแบบที่เกิดจากยีนผิดปกติทั้งสองแห่งของโครโมโซม (homozygote), ยีนที่ผิดปกติเพียงแห่งเดียวของโครโมโซม (heterozygote) และ ไม่พบยีนที่ผิดปกติ (wild-type) ในแต่ละชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา โดยกำหนดค่า percent confidence ในการแปลผลด้วยโปรแกรม Precision Melt Analysis™ มีค่ามากกว่า 95 % และเปรียบเทียบความถูกต้องของชนิดการกลายพันธุ์ที่ได้ด้วยวิธี DNA sequencing

จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

1. คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้มีมติ รับรองโครงการวิจัย เรื่อง การตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค High resolution melting (HRM) analysis (หมายเลขโครงการ : P10034/63) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว เมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2563 (COA No. 132/2020)

2. การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง และไม่ได้กระทำการใดใดโดยตรงต่อร่างกายอาสาสมัคร ทางผู้ทำวิจัยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ หรือตัวอย่างเลือด จากผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าพบการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาแล้ว และทำการเก็บรวบรวมในระหว่างเดือนมกราคม 2559 ถึง ธันวาคม 2562 ซึ่งอันตรายหรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วยหรือเจ้าของตัวอย่างมีเพียงการเปิดเผยข้อมูลผลการวินิจฉัยโดยบังเอิญเท่านั้น ซึ่งผู้ทำวิจัยมีมาตรการในการรักษาความลับโดยจะไม่ทำการเปิดเผยข้อมูลที่สามารถบ่งบอกถึงตัวบุคคลได้

3. ข้อมูลเกี่ยวกับชื่อของอาสาสมัคร หรือเจ้าของตัวอย่างดีเอ็นเอ หรือตัวอย่างเลือด จะได้รับการปกปิดและรักษาความลับโดยการใช้เลขรหัสแทน ชื่อ-นามสกุล และจะถูกบันทึกในคอมพิวเตอร์ที่ต้องใช้รหัสผ่านซึ่งถูกกำหนดโดยผู้ทำวิจัยซึ่งจะไม่มีข้อมูลที่สามารถบ่งบอกถึงตัวบุคคลได้หลุดออกมาจากสถานที่ทำการทดลอง และจะทำการทำลายข้อมูลของผู้ป่วยทั้งในรูปแบบเอกสารและไฟล์ข้อมูลทั้งหมดหลังจากโครงการวิจัยนี้เสร็จสิ้นเป็นเวลา 5 ปี

4. การศึกษาวิจัยนี้ได้กำหนดเกณฑ์การคัดเข้า และออกอย่างชัดเจน เพื่อป้องกัน ความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการตรวจวิเคราะห์อย่างครอบคลุม และปฏิบัติตามหลักความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์กลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบได้บ่อยในประเทศไทย อีกทั้งยังทำการเปรียบเทียบกับวิธี DNA sequencing เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ที่ได้อีกด้วย สำหรับผลการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการแบ่งเป็นหัวข้อต่างๆดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง
2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด
3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ด้วยเทคนิค PCR
4. การออกแบบไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis
5. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis
6. การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis
7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis กับเทคนิค DNA sequencing

การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ทำการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ และตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลอง จากหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาวิทาลัยนเรศวร ประกอบด้วยตัวอย่างที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยแล้วว่าพบการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา รวมทั้งได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือด และตัวอย่างดีเอ็นเอจาก ศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ พุ้เจริญ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัย และพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศาสตราจารย์ ดร.สาคร พรประเสริฐ คณะบดี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ช่วงเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด ตั้งแต่เดือน มกราคม 2559 ถึง ธันวาคม 2562 ซึ่งจำนวนตัวอย่างที่ใช้สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จัดจำแนกตามชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาต่างๆ ดังตาราง 6

ตาราง 6 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยจำแนกตามชนิดการกลายพันธุ์
ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาต่างๆ

ฮีโมโกลบินผิดปกติ	จำนวนตัวอย่าง
1. Hb Constant Spring	21 (8 Heterozygote และ 13 Homozygote)
2. Hb Pakse'	3 (Heterozygote)
3. Hb Quong Sze	1 (Homozygote)
4. Hb Q-Thailand	17 (16 Heterozygote และ 1 Homozygote)
5. Hb Hekinan	3 (1 Heterozygote และ 2 Homozygote)
6. Hb Ananthraj	1 (Heterozygote)
7. Hb Siam	1 (Heterozygote)
8. Hb Queens	1 (Heterozygote)
9. Hb Nakhon Ratchasima	1 (Heterozygote)
10. Hb Thailand	1 (Heterozygote)
11. Hb Pak Num po	1 (Homozygote)
12. Normal control (Wild-type)	10
รวม	61 ตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant) เป็น Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา PureLink™ Genomic DNA Mini Kit แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) จากนั้นทำการคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และการปนเปื้อนของโปรตีน โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของค่า A_{260} และ A_{280} อยู่ที่ 0.65 และ 0.38 ตามลำดับ อัตราส่วนระหว่าง A_{260} ต่อ A_{280} เฉลี่ยอยู่ที่ 1.79 ซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพในการสกัดอยู่ในระดับดี มีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย และมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้เท่ากับ 33.72 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดังตาราง 7

ตาราง 7 ค่าวัดการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ตัวอย่าง	ค่า A ₂₆₀	ค่า A ₂₈₀	ค่า A ₂₆₀ /A ₂₈₀	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/μL)
1	0.64	0.36	1.76	32.00
2	0.68	0.37	1.82	34.00
3	0.62	0.35	1.78	30.90
4	0.94	0.54	1.81	43.00
5	0.96	0.52	1.86	48.00
6	0.69	0.39	1.79	34.70
7	0.67	0.34	1.78	33.40
8	0.76	0.42	1.81	38.10
9	0.45	0.25	1.78	22.40
10	0.66	0.36	1.82	32.90
11	0.61	0.33	1.83	30.40
12	0.52	0.30	1.73	25.80
13	0.65	0.37	1.74	32.50
14	0.61	0.34	1.78	30.40
15	0.75	0.42	1.79	37.40
เฉลี่ย	0.68	0.38	1.79	33.72

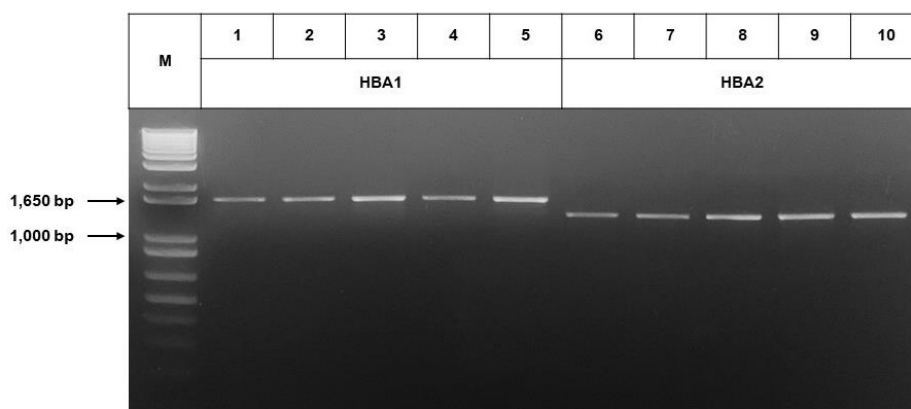
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 ด้วยเทคนิค PCR

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ HBA_T1, HBA1_T2 และ HBA2_T3 ดังตาราง 2 ในการแยกความแตกต่างระหว่างยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1

คู่ไพรเมอร์ HBA_T1 และ HBA2_T3 สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณตำแหน่ง 33433-33451 และ 34760-34736 ตามลำดับจากฐานข้อมูล NCBI Reference Sequence: NG_000006.1 ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 สำหรับดีเอ็นเอของผู้ที่ไม่พบความผิดปกติของยีนแอลฟาไกลบิน 2 รวมไปถึงผู้ที่ยีนแอลฟาซีโรธาลัสซีเมียรูปแบบ Heterozygote ชนิด Southeast Asia deletion และ Thai deletion และผู้ที่มียีนแอลฟาพลัสธาลัสซีเมียรูปแบบ Heterozygote ชนิด -3.7 kb deletion จะได้

ผลผลิต PCR ขนาด 1,300 bp แต่ในรูปแบบ Homozygote ของผู้ที่มียีนแอลฟาธาลัสทั้งชนิดที่เป็นแอลฟาซีโรธาลัสซีเมีย และแอลฟาพลัสธาลัสซีเมียจะไม่เกิดผลผลิต PCR เลยเนื่องจากเกิดการขาดหายไปของดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2

คู่ไพรเมอร์ HBA_T1 และ HBA1_T2 สามารถเข้าจับกับบริเวณของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 37237-37255 และ 38850-38826 ตามลำดับจากฐานข้อมูล NCBI Reference Sequence: NG_000006.1 ของยีนแอลฟาโกลบิน 1 สำหรับดีเอ็นเอของผู้ที่ไม่พบความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบิน 1 รวมไปถึงผู้ที่ยีนแอลฟาซีโรธาลัสซีเมียรูปแบบ Heterozygote ชนิด Southeast Asia deletion และ Thai deletion รวมไปถึงผู้ที่มียีนแอลฟาพลัสธาลัสซีเมียรูปแบบ Heterozygote ชนิด -4.2 kb deletion จะได้ผลผลิต PCR ขนาด 1,600 bp สามารถแสดงผลผลิต PCR ของไพรเมอร์ HBA_T1, HBA1_T2 และ HBA2_T3 ดังภาพ 7



ภาพ 7 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1

หมายเหตุ: M คือ DNA marker (Trackit 1Kb Plus DNA Ladder) หมายเลข 1-5 คือผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 1 และ หมายเลข 6-10 คือผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis

จากการนำผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger DNA sequencing จึงนำข้อมูลของผลลัพธ์ที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis โดยได้ทำการแบ่งเป็นกลุ่ม (set) ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแต่ละ Exon ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 เป็นจำนวน 3 กลุ่ม ประกอบด้วย

1. กลุ่มไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 1 ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1

ไพรเมอร์กลุ่มนี้ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R และคู่ไพรเมอร์ E12F/E12R ตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณ Exon ที่ 1 ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 เนื่องจากบริเวณของยีนทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน โดยที่ผลผลิต PCR ของคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R อยู่ที่ 143 bp ส่วนคู่ไพรเมอร์ E12F/E12R อยู่ที่ 154 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และค่า T_m ของไพรเมอร์แสดงดังตาราง 4 และตำแหน่งของแต่ละคู่ไพรเมอร์แสดง ดังภาพ 8



ภาพ 8 ตำแหน่งไพรเมอร์ E1F/E1R (สีเหลือง) และไพรเมอร์ E12F/E12R (สีเขียว) ที่จำเพาะต่อ Exon ที่ 1 ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 (บน) และยีนแอลฟาไกลบิน 1 (ล่าง)

2. กลุ่มไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1

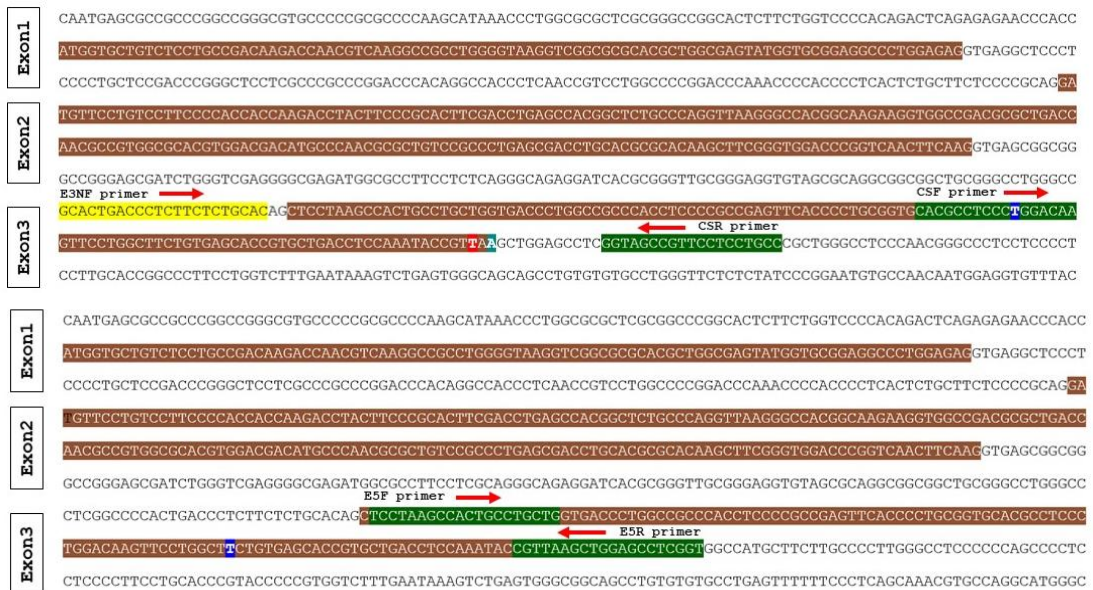
ไพรเมอร์กลุ่มนี้ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR และคู่ไพรเมอร์ EQF/EQR ตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ได้เช่นเดียวกัน โดยที่ผลผลิต PCR ของคู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR อยู่ที่ 147 bp ส่วนคู่ไพรเมอร์ EQF/EQR อยู่ที่ 145 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์พร้อมค่าค่า T_m ของไพรเมอร์แสดงดังตาราง 4 และตำแหน่งของแต่ละคู่ไพรเมอร์แสดงดังภาพ 9



ภาพ 9 ตำแหน่งไพรเมอร์ E4TF/E4TR (สีเหลือง) และไพรเมอร์ EQF/EQR (สีเขียว) ที่จำเพาะต่อ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 (ภาพบน) และยีนแอลฟาโกลบิน 1 (ภาพล่าง)

3. กลุ่มไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 3 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1

ไพรเมอร์กลุ่มนี้ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ CSF/CSR สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณ Exon ที่ 3 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 ได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยที่ผลผลิตของ PCR อยู่ที่ 93 bp ส่วนคู่ไพรเมอร์ E5F/E5R มีความจำเพาะต่อยีนแอลฟาโกลบิน 1 เท่านั้น โดยที่ผลผลิต PCR อยู่ที่ 142 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์พร้อมค่า T_m ของไพรเมอร์แสดงดังตาราง 4 และตำแหน่งของแต่ละคู่ไพรเมอร์ดังภาพ 10



ภาพ 10 ตำแหน่งไพรเมอร์ CSF/CSR (สีเขียว) และไพรเมอร์ E5F/E5R (สีชมพู) ที่จำเพาะต่อ Exon ที่ 3 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 (บน) และยีนแอลฟาโกลบิน 1 (ล่าง)

การทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR

การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ และความจำเพาะของแต่ละคู่ไพรเมอร์ ในการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ได้ทำการแบ่งการทดสอบดังนี้

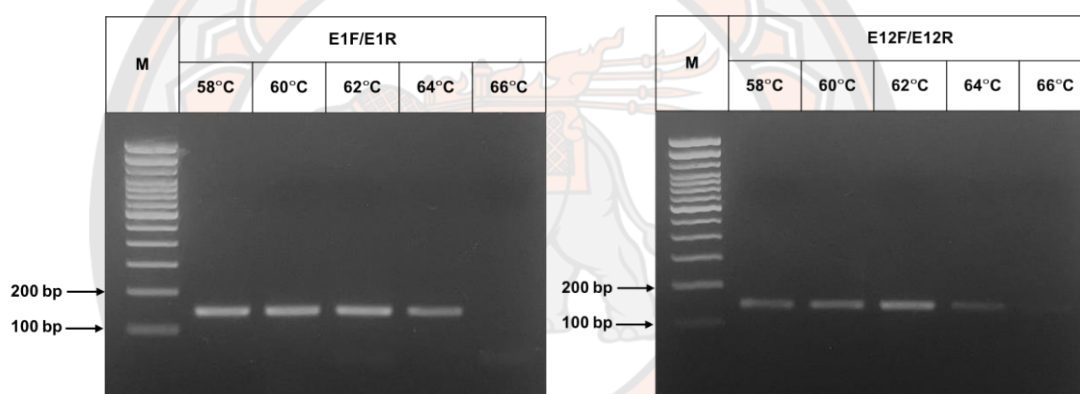
1. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค

Conventional PCR

การกำหนดช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยเฉพาะในขั้นตอน Annealing จะพิจารณาจากค่า T_m ของแต่ละคู่ไพรเมอร์เป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิที่ต่ำเกินไปจะยิ่งเพิ่มโอกาสในการเกิดการเข้าจับกันอย่างไม่จำเพาะระหว่างไพรเมอร์กับบริเวณตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย และอาจเกิดการจับกันเองระหว่างไพรเมอร์ ในขณะที่การใช้อุณหภูมิที่สูงก็จะลดโอกาสในการเข้าจับกันของไพรเมอร์และส่งผลให้เกิดผลผลิต PCR ลดลงหรือไม่เกิดเลย โดยได้กำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบของช่วง Annealing อยู่ที่ 58, 60, 62, 64 และ 66 องศาเซลเซียส และจากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์อยู่ที่ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 58-62 องศาเซลเซียส โดยรายละเอียดสามารถแสดงดังต่อไปนี้

1.1 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R และคู่ไพรเมอร์ E12F/E12R

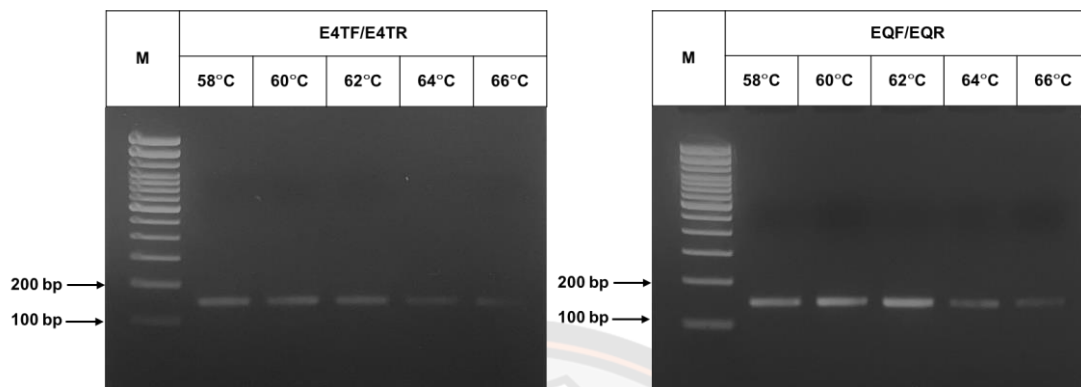
ผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R และไพรเมอร์ E12F/E12R จากอุณหภูมิที่ใช้ในช่วง Annealing ที่ 58, 60, 62, 64 และ 66 องศาเซลเซียส (สภาวะที่ทดสอบจากตาราง 5) เมื่อนำมาตรวจสอบด้วย 2 เฟอร์เซนต์ อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าทุกอุณหภูมิที่ทดสอบในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ มีขนาดมากกว่า 100 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้จากการคำนวณของคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R และ E12F/E12R อยู่ที่ 143 และ 154 bp ตามลำดับ จากผลอะกาโรสเจลพบว่าที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส ไม่สามารถตรวจพบผลผลิต PCR จากคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R ได้ ในขณะที่อุณหภูมิ 64 และ 66 องศาเซลเซียส พบผลผลิต PCR ที่น้อยลงอย่างชัดเจนจากคู่ไพรเมอร์ E12F/E12R ดังภาพ 11



ภาพ 11 ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ E1F/E1R (ซ้าย) และไพรเมอร์ E12F/E12R (ขวา) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 58, 60, 62, 64 และ 66 องศาเซลเซียส

1.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของคู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR และคู่ไพรเมอร์ EQF/EQR

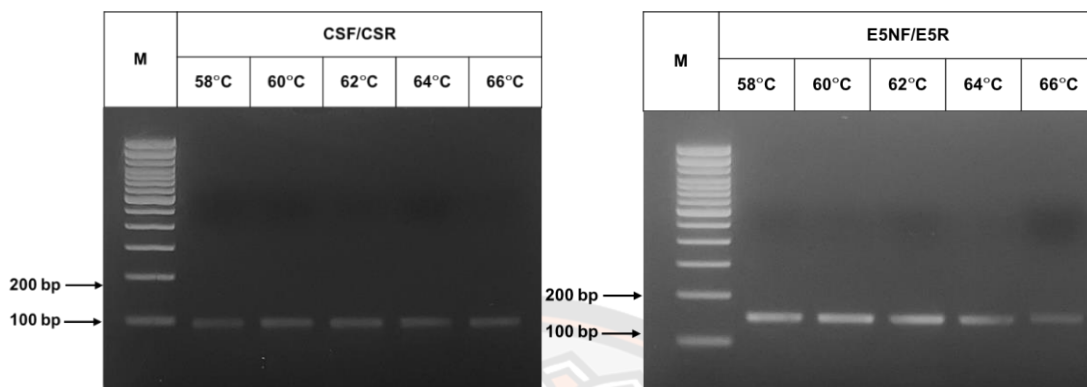
ไพรเมอร์ E4TF/E4TR และ EQF/EQR เมื่อนำมาตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 2 เฟอร์เซนต์ อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ปรากฏแบนดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ มีขนาดมากกว่า 100 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้จากการคำนวณของคู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR และ EQF/EQR อยู่ที่ 147 และ 145 bp ตามลำดับเช่นเดียวกัน และจากผลอะกาโรสเจลพบว่าที่อุณหภูมิในช่วง Annealing ตั้งแต่ 58 ถึง 62 องศาเซลเซียส ปรากฏแบนดีเอ็นเออย่างชัดเจน ในขณะที่อุณหภูมิ 64 และ 66 องศาเซลเซียส ผลผลิต PCR น้อยลงอย่างเห็นได้ชัดจากทั้งคู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR และ EQF/EQR ดังภาพ 12



ภาพ 12 ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ E4TF/E4TR (ซ้าย) และไพรเมอร์ EQF/EQR (ขวา) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 58, 60, 62, 64 และ 66 องศาเซลเซียส

1.3 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของคู่ไพรเมอร์ CSF/CSR และคู่ไพรเมอร์ E5F/E5R

ทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์ CSF/CSR และ E5F/E5R ต่างก็มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 3 ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 ตามลำดับ แต่สามารถใช้ CSF ซึ่งเป็นไพรเมอร์ชนิดที่ออกแบบจากบริเวณปลาย 5'-ของดีเอ็นเอแม่แบบ (forward primer) ร่วมกับไพรเมอร์ E5R ที่เป็นไพรเมอร์ชนิดที่ออกแบบจากบริเวณปลาย 3'-ของดีเอ็นเอแม่แบบ (reverse primer) และให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดแตกต่างกันได้ เมื่อนำมาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ปรากฏแบนดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ มีขนาดใกล้เคียง 100 และ 150 bp ตามลำดับ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ CSF/CSR และ E5F/E5R ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในช่วง Annealing ที่ 58, 60, 62, 64 และ 66 องศาเซลเซียส ของทั้ง 2 ไพรเมอร์ พบว่า ที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ E5F/E5R มีปริมาณผลผลิต PCR แตกต่างจากอุณหภูมิอื่นอย่างชัดเจน ในขณะที่การทดสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ CSF/CSR ไม่พบความแตกต่างในทุกช่วงอุณหภูมิ ดังภาพ 13



ภาพ 13 ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ CSF/CSR (ซ้าย) และไพรเมอร์ E5F/ER (ขวา) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 58, 60, 62, 64 และ 66 องศาเซลเซียส

จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing ของการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แบบ Conventional โดยใช้ชุดน้ำยา Platinum™*Taq* DNA Polymerase จาก Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Germany) และเป็นชุดน้ำยาเดียวกับที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนในการปรับสภาวะที่เหมาะสมของน้ำยาลงในขั้นตอนการทำ Real-time PCR เมื่อพิจารณาถึงอุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ในแต่ละขั้นตอนของการทำ PCR ดังตาราง 5 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากแต่ละคู่ไพรเมอร์ จะใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่า ทุกคู่ไพรเมอร์ที่ทดสอบจะปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่มีจำเพาะและขนาดตามที่ต้องการ ไม่พบภาวะการเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ (primer dimer) และจะใช้สภาวะดังกล่าวในการทดสอบสำหรับขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียม ($MgCl_2$) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis

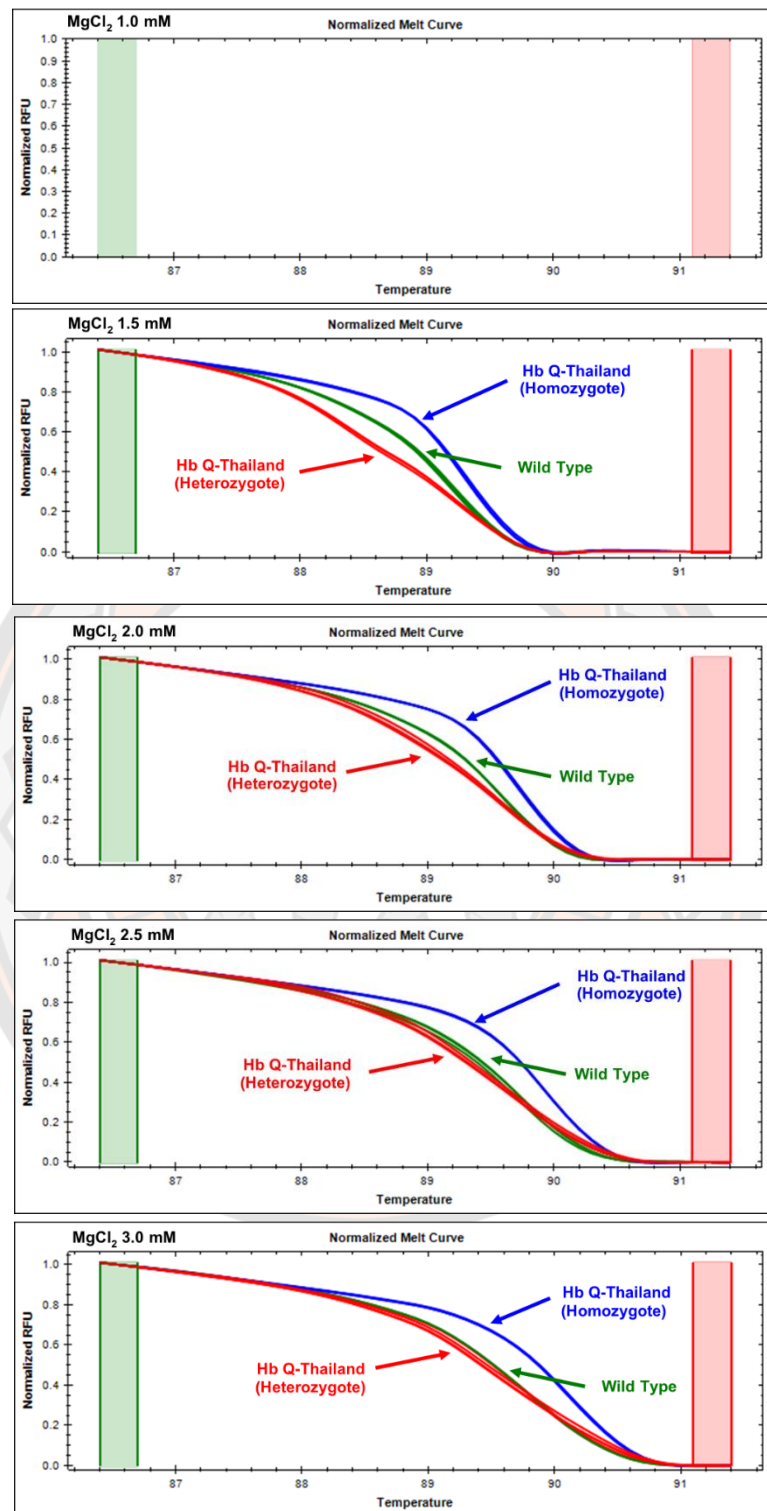
ปฏิกิริยา Real-time PCR ในการทดลองนี้ เลือกใช้สภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสม ดังตาราง 8 และทดสอบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis โดยใช้ไพรเมอร์ EQF/EQR ในการทดสอบแยกจีโนไทป์ของตัวอย่างชนิด Hb Q-Thailand ทั้งในรูปแบบ Heterozygote, Homozygote และตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติ (Wild-type) โดยแต่ละชนิดของรูปแบบการกลายพันธุ์จะทำแบบ

3 ซ้ำ (triplicate) ผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ส่งผลให้เกิดการเลื่อนของกราฟ Melting curve และมีแนวโน้มของช่วงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสี SYTO™ 9 Green เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ 3.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของ Hb Q-Thailand ในรูปแบบ Heterozygote กับตัวอย่างที่เป็น Wild-type ออกมาได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Real-time PCR อยู่ที่ 1.5 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ไม่เกิดผลผลิต PCR จึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อสร้าง Melting curve ได้ ดังภาพ 14

ความเข้มข้นของของ $MgCl_2$ ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis เป็นอย่างมาก (Dehbashi, Tahmasebi, Sedighi, Davarian, & Arabestani, 2020) เนื่องจากทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญของ *Taq* DNA polymerase มีการศึกษาพบว่า $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นสูงส่งผลต่อปริมาณผลผลิต PCR เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 1 มิลลิโมลาร์) อาจส่งผลให้ไม่เกิดผลผลิต PCR เลย (Harris & Jones, 1997) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgCl_2$ ต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis มีความแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา โดยขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของแต่ละจีโนไทป์ และโปรแกรมในการวิเคราะห์ HRM analysis (Le Tri et al., 2016)

ตาราง 8 สภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของไพรเมอร์ สำหรับการตรวจวิเคราะห์กลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา

Condition	Primers	
Initial activation	95°C, 2 min	} 45 Cycles
Denaturation	95°C, 20 sec	
Annealing	60°C, 15 sec	
Extension	72°C, 15 sec	
Final extension	72°C, 5 min	
Number of cycles	45	
Melt curve analysis	95°C, 10 sec and 75-95°C, increment 0.2°C every 10 sec	



ภาพ 14 ความเข้มข้น $MgCl_2$ ส่งผลต่อลักษณะของ Normalized melting curve จากเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM ด้วยคู่มือ EQF/EQR ที่มีการเติม Q-Solution

การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis

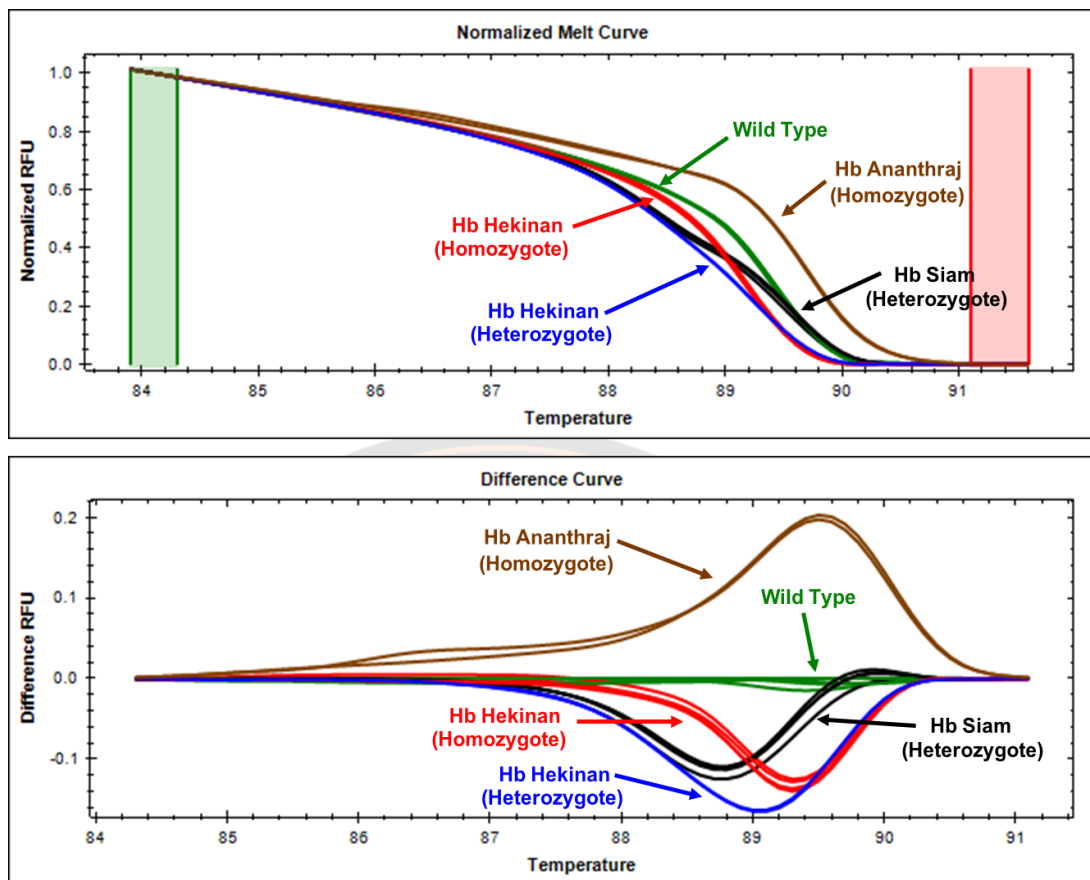
การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการแบ่ง ผลการวิเคราะห์ออกเป็น แต่ละ Exon ที่พบตำแหน่งการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1

1. ผลการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาบริเวณ Exon ที่ 1 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1

ไพรเมอร์ E1F/E1R และไพรเมอร์ E12F/E12R มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 1 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ได้แก่ Hb Siam 1 ตัวอย่าง, Hb Hekinan 3 ตัวอย่าง, Hb Ananthraj (สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ จาก GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific, Germany) 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในบริเวณดังกล่าว และตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติบริเวณดังกล่าว 3 ตัวอย่าง โดยแต่ละชนิดของรูปแบบการกลายพันธุ์จะทำแบบ 3 ซ้ำ (triplicate) ผลการทดลองสามารถแบ่งตามแต่ละคู่ไพรเมอร์ได้ ดังนี้

1.1 คู่ไพรเมอร์ E1F/E1R

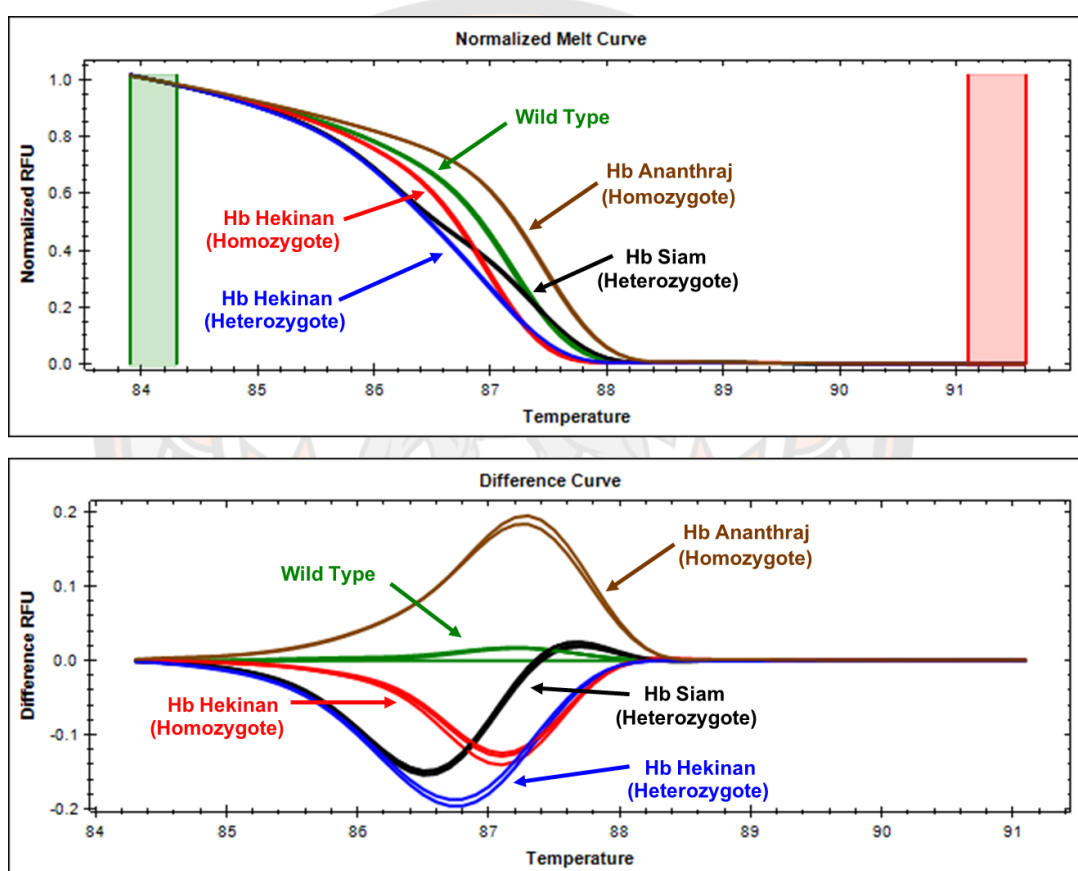
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR และใช้โปรแกรม Precision Melt Analysis™ ในการวิเคราะห์ HRM analysis พบลักษณะรูปร่างของ Normalized melting curve ที่แตกต่างกันแบ่งเป็น 4 กลุ่ม อย่างชัดเจน ดังภาพ 15 (ภาพบน) คือกลุ่มตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติ (Wild-type, แสดงด้วยสีเขียว) กับตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งชนิด Hb Siam (สีดำ), Hb Ananthraj (สีน้ำตาล) และ Hb Hekinan (สีน้ำเงินและสีแดง) โดยเฉพาะตัวอย่างของ Hb Hekinan ที่พบลักษณะของ Melting curve ที่แตกต่างกันจำนวน 2 รูปแบบ และเมื่อทำการตรวจสอบรูปแบบที่ต่างกันดังกล่าวด้วยวิธี DNA sequencing พบการกลายพันธุ์ทั้งชนิดที่เป็นรูปแบบ Homozygote และ Heterozygote จึงทำให้มีความแตกต่างของกราฟที่ปรากฏออกมา เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟ Difference curve เพื่อขยายความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงในตัวอย่างดีเอ็นเอ ให้สามารถเห็นได้เด่นชัดขึ้น ดังภาพ 15 (ภาพล่าง) จะพบลักษณะของ Melting curve ที่ชัดเจนว่าสามารถจัดจำแนกออกเป็น 4 รูปแบบ เช่นเดียวกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงช่วงของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสี SYTO™9 Green จากทุกตัวอย่างของดีเอ็นเอ จะอยู่ที่ 87- 91 องศาเซลเซียส พบว่ามีความแตกต่างจากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis ในบริเวณยีนบีตาโกลบิน ซึ่งจะอยู่ที่ 83-87 องศาเซลเซียส (Laochinchat & Jindadamrongwech, 2017) อันเนื่องมาจากปริมาณของ % GC content ในยีนแอลฟาโกลบินที่สูงมากกว่ายีนบีตาโกลบิน (Uprasert et al., 2017)



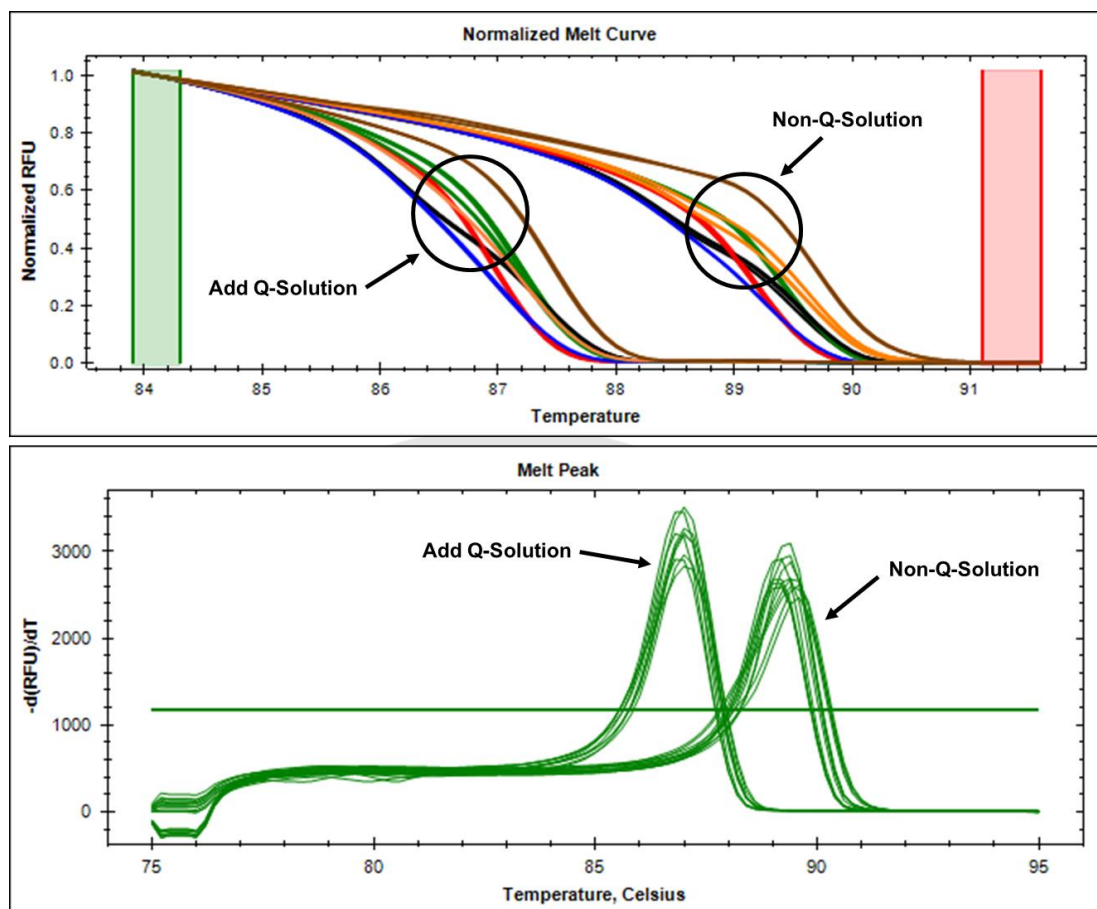
ภาพ 15 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R; Wild-type (สีเขียว), Hb Siam heterozygote (สีดำ), Hb Hekinan homozygote (สีน้ำเงิน), Hb Hekinan homozygote (สีแดง) และ Hb Ananthraj (สีน้ำตาล)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ในตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่มี % GC content สูง โดยเฉพาะยีนแอลฟาโกลบินที่พบถึง 60-80 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถเกิดโครงสร้างแบบทุติยภูมิ (secondary structure) ของสายดีเอ็นเอได้ง่าย (Uaprasert et al., 2017) และจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นในขั้นตอนวิเคราะห์ HRM analysis อีกทั้งยังพบปัญหาในการไม่สามารถแยกความแตกต่างในบางตำแหน่งของการกลายพันธุ์ได้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จึงได้ทำการทดลองโดยการเติมน้ำยา Q-Solution จาก Qiagen (Hilden, Germany) ซึ่งเป็นน้ำยาสำเร็จรูป ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ Dimethyl sulfoxide (DMSO) เนื่องจากมีการรายงานพบว่า DMSO ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำ PCR สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มี % GC content สูง และจากการทดลองพบว่า DMSO ช่วยเพิ่มความไว (sensitivity) และลดค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของดีเอ็นเอ (Jensen, Fukushima, & Davis, 2010) จึงได้นำไปสู่การทดลอง โดยการเติม 1X Q-Solution

ลงไปในการละลายผสม (master mix) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ซึ่งผลการทดลองพบลักษณะรูปร่างของ Normalized melting curve และ Difference curve ที่แตกต่างกันจำแนกเป็น 4 กลุ่ม อย่างชัดเจน ดังภาพ 16 และเมื่อทำการเปรียบเทียบการทดลองที่มีการเติม Q-Solution พบว่าค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของตัวอย่างดีเอ็นเอลดลง ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่เติมอย่างชัดเจน ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ทำให้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนขึ้น อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความจำเพาะของค่า T_m โดยสังเกตได้จากลักษณะของ Melt peak ที่ปรากฏ ดังภาพ 17



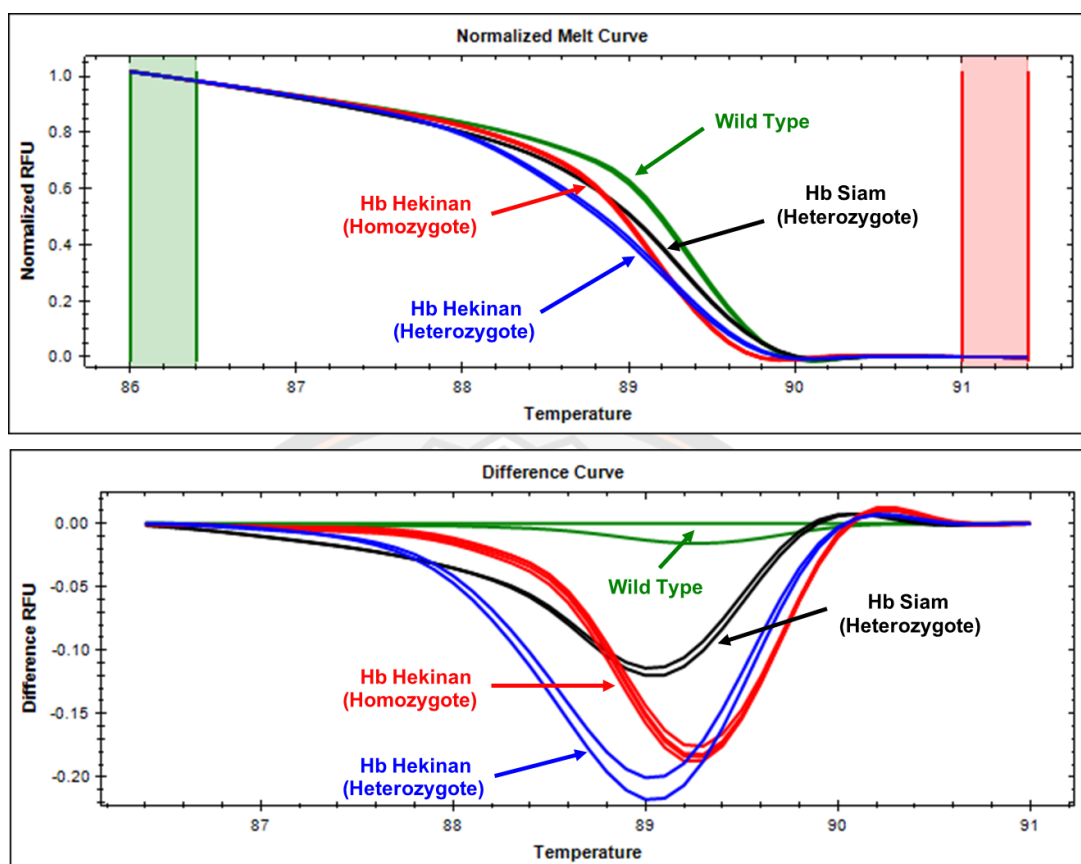
ภาพ 16 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่มือ E1F/E1R ที่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีเขียว), Hb Siam heterozygote (สีดำ), Hb Hekinan heterozygote (สีน้ำเงิน), Hb Hekinan homozygote (สีแดง) และ Hb Ananthraj (สีน้ำตาล)



ภาพ 17 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง)
เปรียบเทียบการเติม และไม่เติม Q-Solution จากคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R

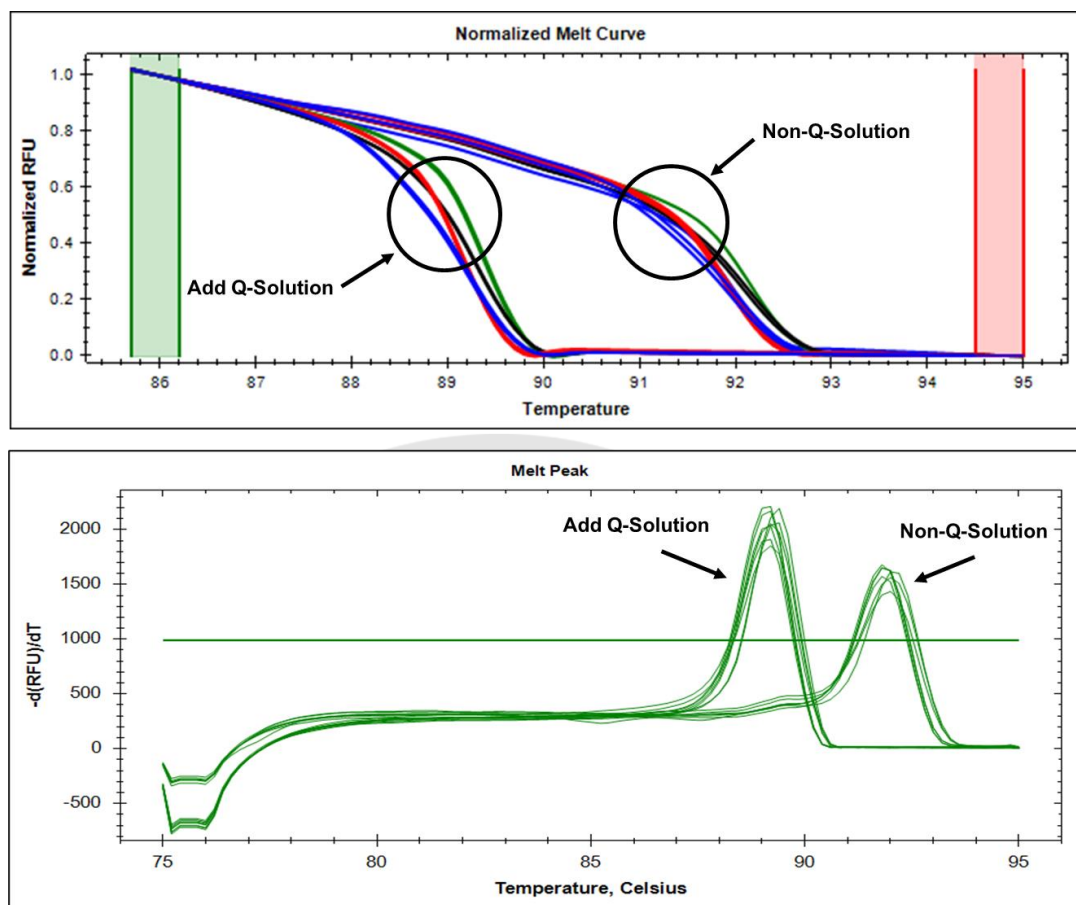
1.2 คู่ไพรเมอร์ E12F/E12R

การออกแบบคู่ไพรเมอร์ E12F/E12R มีความแตกต่างจากคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R ตรงบริเวณตำแหน่งที่ครอบคลุมการตรวจการกลายพันธุ์ไปยังบางส่วนของบริเวณ Intron ที่ 1 ของยีน แอลฟาไกลบิน 2 และยีนแอลฟาไกลบิน 1 ซึ่งอาจใช้สำหรับตรวจหารูปแบบการกลายพันธุ์ที่หายาก ในอนาคต เนื่องจากการรายงานการตรวจพบชนิดการกลายพันธุ์ Initiation codon deletion A ของยีนแอลฟาไกลบิน 2 (Viprakasit et al., 2014), Initiation codon deletion T ของยีนแอลฟา ไกลบิน 2 และ Donor splice site mutation at IVS1-I ของยีนแอลฟาไกลบิน 1 (Suwannasing et al., 2016) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR และใช้โปรแกรม Precision Melt Analysis™ ในการวิเคราะห์ HRM analysis พบลักษณะรูปร่างของ Normalized melting curve ที่แตกต่างกันเป็น 4 กลุ่ม อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R แต่มีลักษณะของ รูปแบบที่แตกต่างกัน ดังภาพ 18



ภาพ 18 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่มือ E12F/E12R ที่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีเขียว), Hb Siam heterozygote (สีดำ), Hb Hekinan homozygote (สีน้ำเงิน) และ Hb Hekinan homozygote (สีแดง)

เมื่อทำการเปรียบเทียบการทดลองที่มีการเติมและไม่เติม Q-Solution พบความแตกต่างอย่างชัดเจนจากภาพที่ 19 โดยการทดลองที่ไม่มีการเติม Q-Solution พบช่วงของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสี SYTO™ 9 Green จากทุกตัวอย่างของดีเอ็นเอจะอยู่ที่ 91-93 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าการทดลองที่มีการเติม Q-Solution โดยพบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วง 88-90 องศาเซลเซียส และพบว่า ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของตัวอย่างดีเอ็นเอลดลงหากมีการเติม Q-Solution ลงไปในการทดลอง



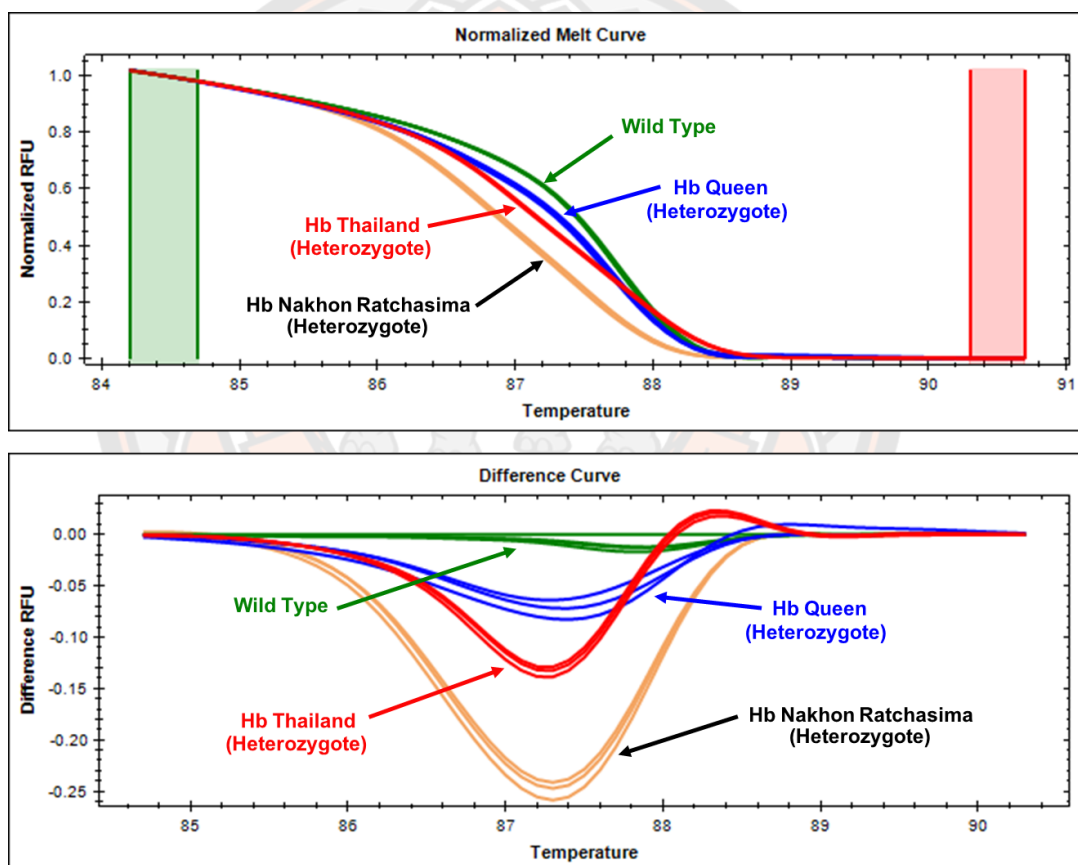
ภาพ 19 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง)
เปรียบเทียบการเติม และไม่เติม Q-Solution จากคูไพรเมอร์ E12F/E12R

2. ผลการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาบริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1

คูไพรเมอร์ E4TF/E4TR และคูไพรเมอร์ EQF/EQR มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ได้แก่ Hb Q-Thailand 17 ตัวอย่าง (โดย Hb Q-Thailand ในรูปแบบ Homozygote ทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ จาก GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific, Germany), Hb Thailand 1 ตัวอย่าง, Hb Queens 1 ตัวอย่าง, Hb Nakhon Ratchasima 1 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดเป็นชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในบริเวณดังกล่าว และตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติบริเวณดังกล่าว 5 ตัวอย่าง โดยแต่ละชนิดของรูปแบบการกลายพันธุ์จะทำแบบ 3 ซ้ำ เช่นเดียวกัน ผลการทดลองสามารถแบ่งตามแต่ละคูไพรเมอร์ได้ ดังนี้

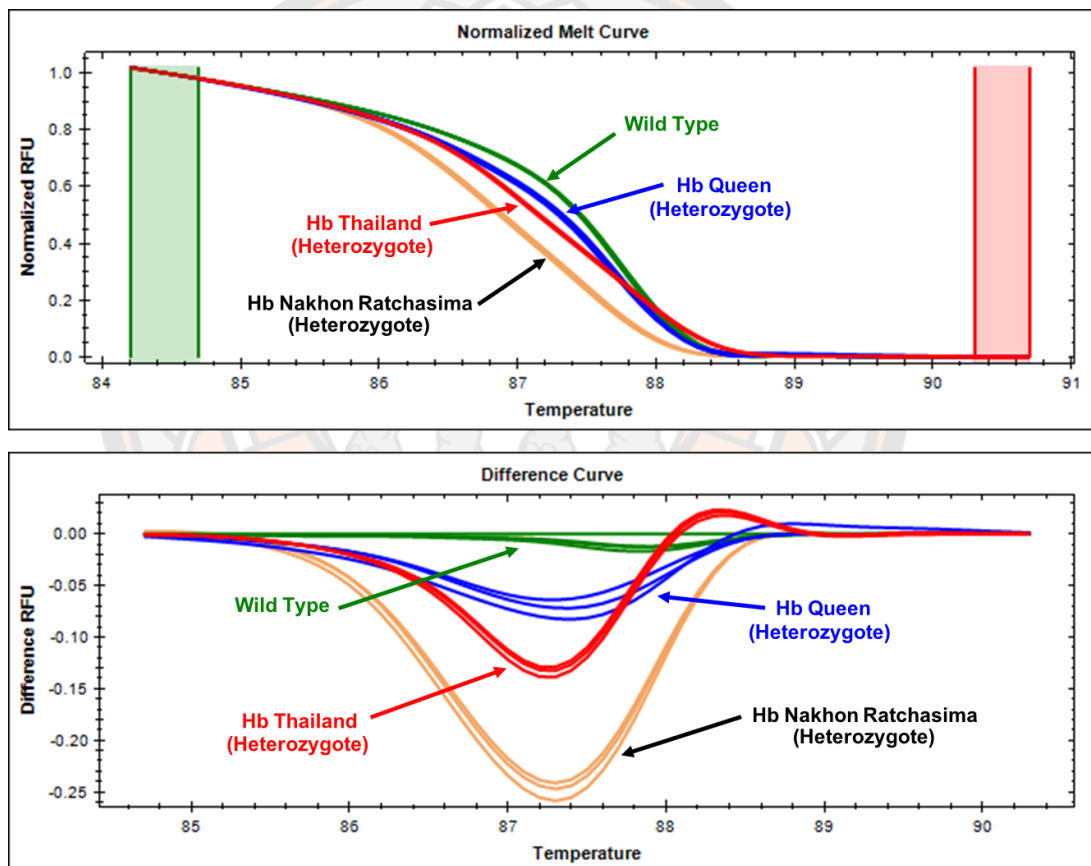
2.1 คู่มือไพรเมอร์ E4TF/E4TR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR และใช้โปรแกรม Precision Melt Analysis™ ในการวิเคราะห์ HRM analysis พบลักษณะรูปร่างของ Normalized melting curve และ Difference curve ที่แตกต่างกันเป็น 4 กลุ่ม อย่างชัดเจน สามารถแบ่งออกเป็น กลุ่มตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติ (Wild-type, แสดงด้วยสีเขียว) กับตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งชนิด Hb Thailand (สีแดง), Hb Queens (สีน้ำเงิน) และ Hb Nakhon Ratchasima (สีส้ม) มีค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสี SYTO™ 9 Green จากทุกตัวอย่างของดีเอ็นเอจะอยู่ที่ 85-89 องศาเซลเซียส จากการทดลองที่มีการเติม Q-Solution ดังภาพ 20

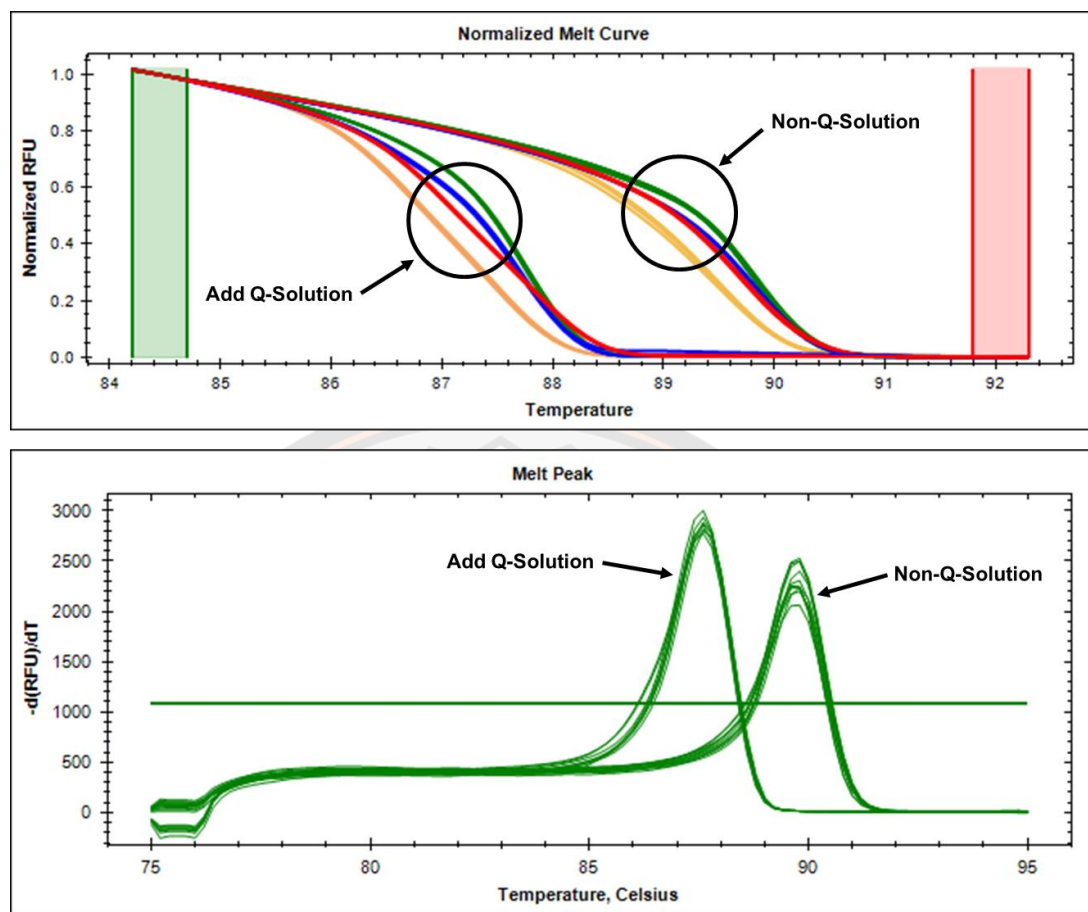


ภาพ 20 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่มือไพรเมอร์ E4TF/E4TR ที่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีเขียว), Hb Thailand (สีแดง), Hb Queens (สีน้ำเงิน) และ Hb Nakhon Ratchasima (สีส้ม)

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเติม และไม่เติม Q-Solution พบว่าตัวอย่าง Hb Thailand (สีแดง), Hb Queens (สีน้ำเงิน) ในการทดลองที่ไม่มีการเติม Q-Solution ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนของทั้ง 2 ชนิด นี้ได้ ดังแสดงในภาพที่ 21 พบว่า Hb Thailand (c.56 A>C) และ Hb Queens (c.34T>G) มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของตัวอย่างดีเอ็นเอในระดับที่ใกล้เคียงกัน (Gundry et al., 2003) แม้จะพบว่าตำแหน่งของการกลายพันธุ์บริเวณโคดอน (codon) ที่แตกต่างกัน ในขณะที่ Hb Nakhon Ratchasima (c.63 C>T) มีการเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลต่อค่า T_m มากกว่า การทดลองที่มีการเติมสารอย่าง Q-Solution จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ได้ ดังภาพ 22



ภาพ 21 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่มือ E4TF/E4TR ที่ไม่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีเขียว), Hb Thailand (สีแดง), Hb Queens (สีน้ำเงิน) และ Hb Nakhon Ratchasima (สีส้ม)

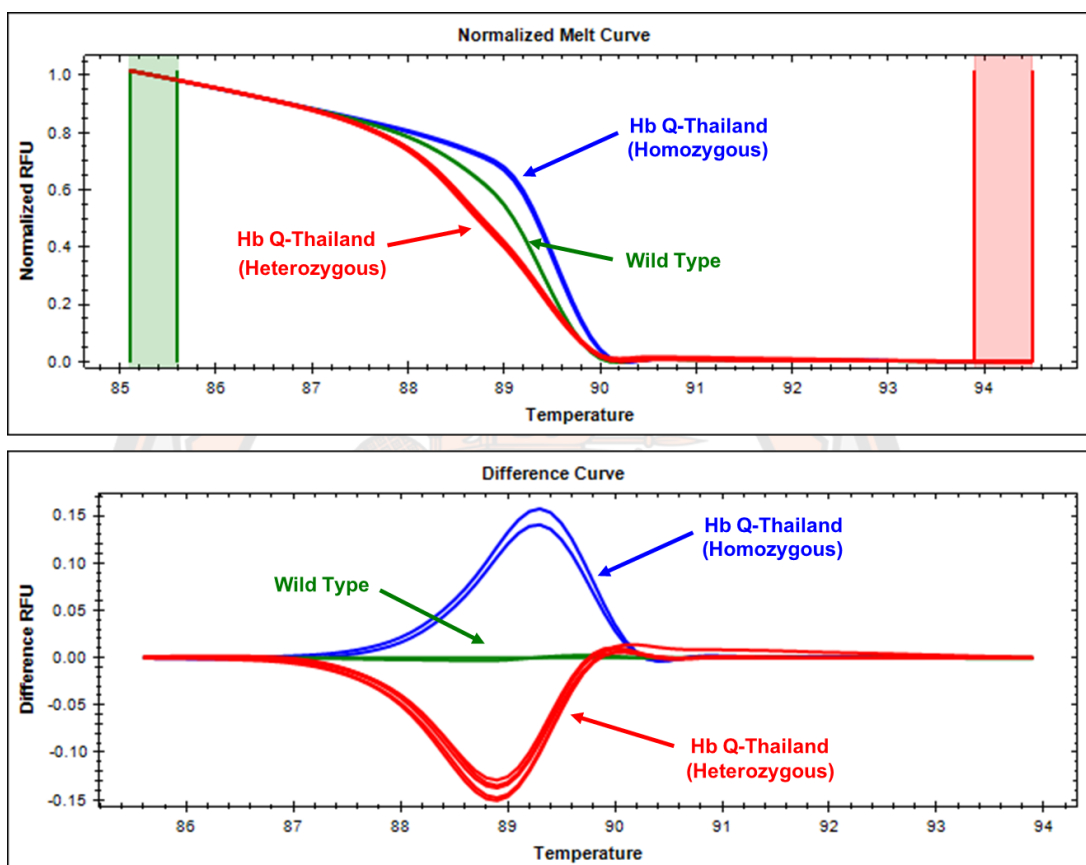


ภาพ 22 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง)
เปรียบเทียบการเติม และไม่เติม Q-Solution จากไพรเมอร์ E4TF/E4TR

2.2 คู่ไพรเมอร์ EQF/EQR

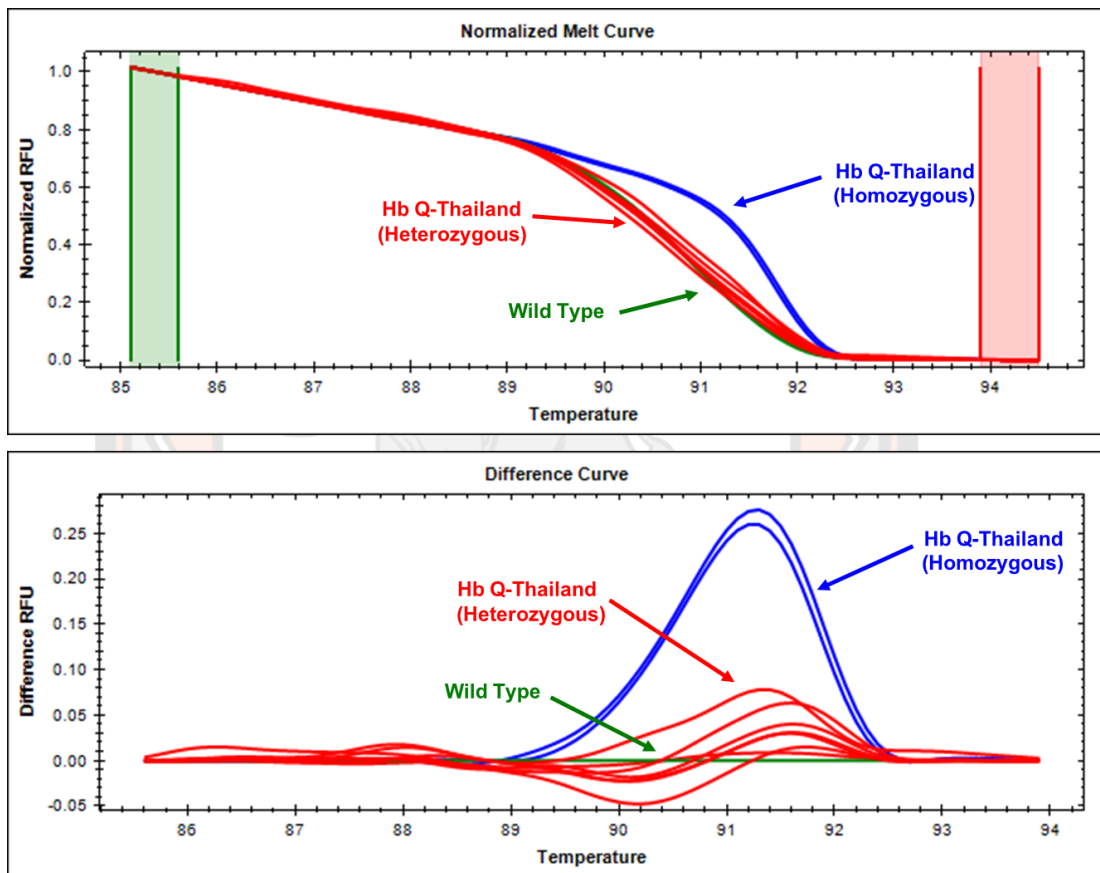
Hb Q-Thailand เป็นการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง Codon ที่ 74 ซึ่งพบว่าเป็นตำแหน่งที่ตรงกับไพรเมอร์ E4TR เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis พบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของรูปแบบการกลายพันธุ์ จึงได้ทำการออกแบบคู่ไพรเมอร์ EQF/EQR ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 2 เช่นเดียวกัน และออกแบบให้ครอบคลุมตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ Hb Q-Thailand อีกทั้งยังครอบคลุมตำแหน่งที่เหลือของ Exon ที่ 2 ถัดจากบริเวณของคู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR ดังภาพ 8 เนื่องจากบริเวณ Exon ที่ 2 ขนาดอยู่ที่ 205 bp จึงจำเป็นต้องอาศัยไพรเมอร์อย่างน้อย 2 คู่มาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อครอบคลุมทุกบริเวณดังกล่าว ผลการทดลองพบว่าการวิเคราะห์ด้วย HRM analysis ด้วยคู่ไพรเมอร์ EQF/EQR ผลผลิต PCR มีค่าการเปลี่ยนแปลงของสารเรืองแสง Fluorescence ชนิด SYTO™ 9 Green อย่างรวดเร็วในช่วง

อุณหภูมิ 87-90 องศาเซลเซียส และเมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างกราฟพบว่าลักษณะของ Melting curve ที่ได้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ตามแต่ละจีโนไทป์ได้อย่างชัดเจน คือ Wild-type (สีเขียว), Hb Q-Thailand heterozygote (สีแดง) และ Hb Q-Thailand homozygote (สีน้ำเงิน) ดังแสดงด้วยเส้นกราฟ สีเขียว แดง และน้ำเงิน ตามลำดับ ดังภาพ 23



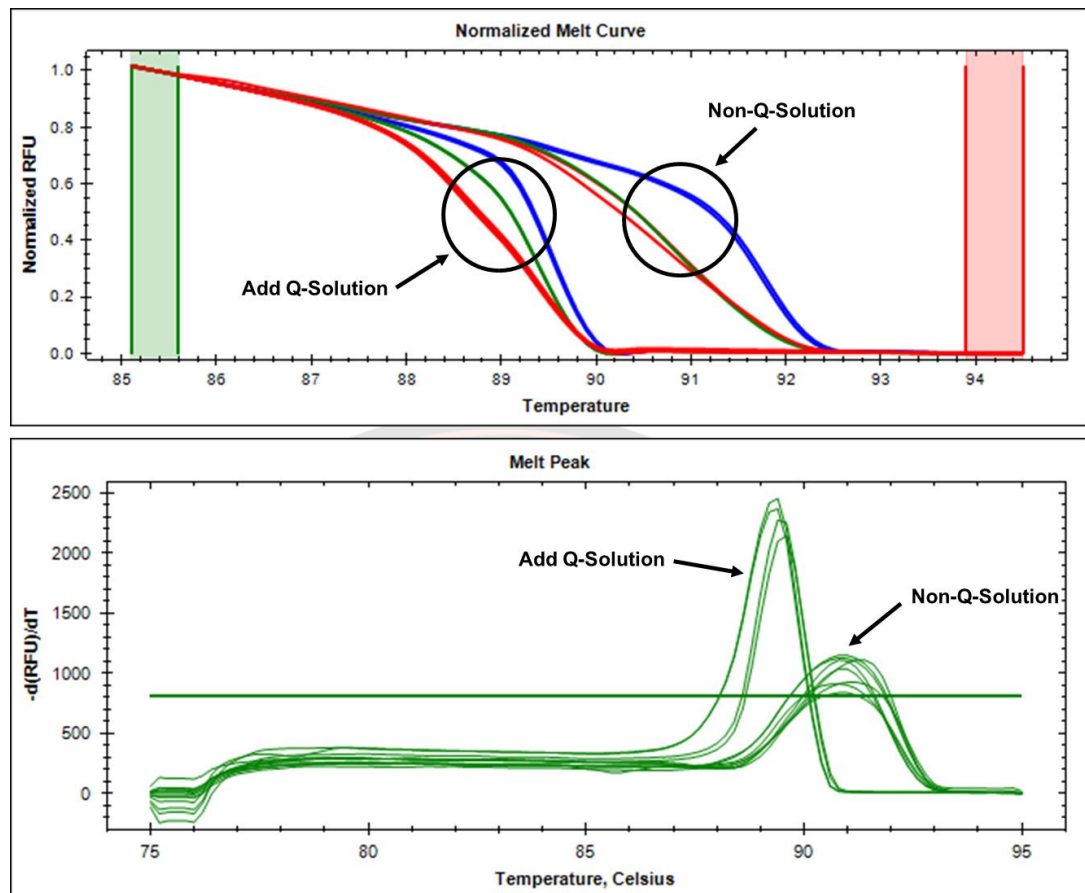
ภาพ 23 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่มือ EQF/EQR ที่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีเขียว), Hb Q-Thailand heterozygote (สีแดง) และ Hb Q-Thailand homozygote (สีน้ำเงิน)

จากการศึกษาการไม่เต็ม Q-Solution ร่วมด้วยในปฏิกิริยา เมื่อทำการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค HRM analysis จากคู่มือ EQF/EQR พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างชนิดที่เป็น Wild-type กับ Hb Q-Thailand ในรูปแบบ Heterozygote ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังภาพ 24 การเติม Q-Solution จะยังช่วยลดช่วยเพิ่มความไว (sensitivity) และลดค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) ของผลผลิต PCR ลง เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีการไม่เติม Q-Solution ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของทั้ง 3 จีโนไทป์ ออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ดังภาพ 25



ภาพ 24 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่มือ EQF/EQR ที่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีเขียว), Hb Q-Thailand heterozygote (สีแดง) และ Hb Q-Thailand homozygote (สีน้ำเงิน)



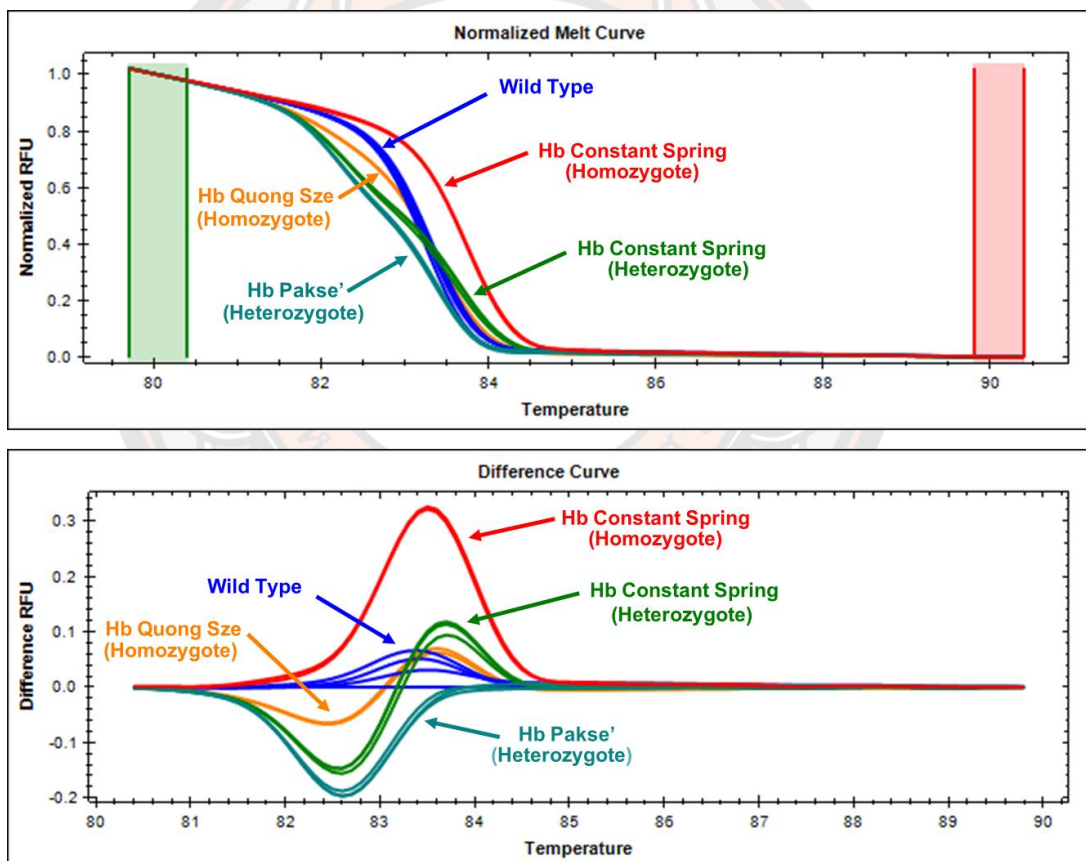
ภาพ 25 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง)
เปรียบเทียบการเติมและไม่เติม Q-Solution จากคูไพรเมอร์ EQF/EQR

3. ผลการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาบริเวณ Exon ที่ 3 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1

คูไพรเมอร์ CSF/CSR และคูไพรเมอร์ E5F/E5R มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ตามลำดับ เนื่องจากบริเวณ 3' Non-coding region ของทั้ง 2 ยีน มีลำดับนิวคลีโอไทป์ที่แตกต่างกัน สำหรับการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา ได้แก่ Hb Constant Spring 21 ตัวอย่าง, Hb Pakse' 3 ตัวอย่าง, Hb Quong Sze 1 ตัวอย่าง และ Hb Pak Num po 1 ตัวอย่าง (โดยทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ ในรูปแบบ Homozygote จาก GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific, Germany) ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดเป็นชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในบริเวณดังกล่าว และตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติบริเวณดังกล่าว 5 ตัวอย่าง โดยแต่ละชนิดของรูปแบบการกลายพันธุ์จะทำแบบ 3 ซ้ำ เช่นเดียวกัน ผลการทดลองสามารถแบ่งตามแต่ละคูไพรเมอร์ได้ ดังนี้

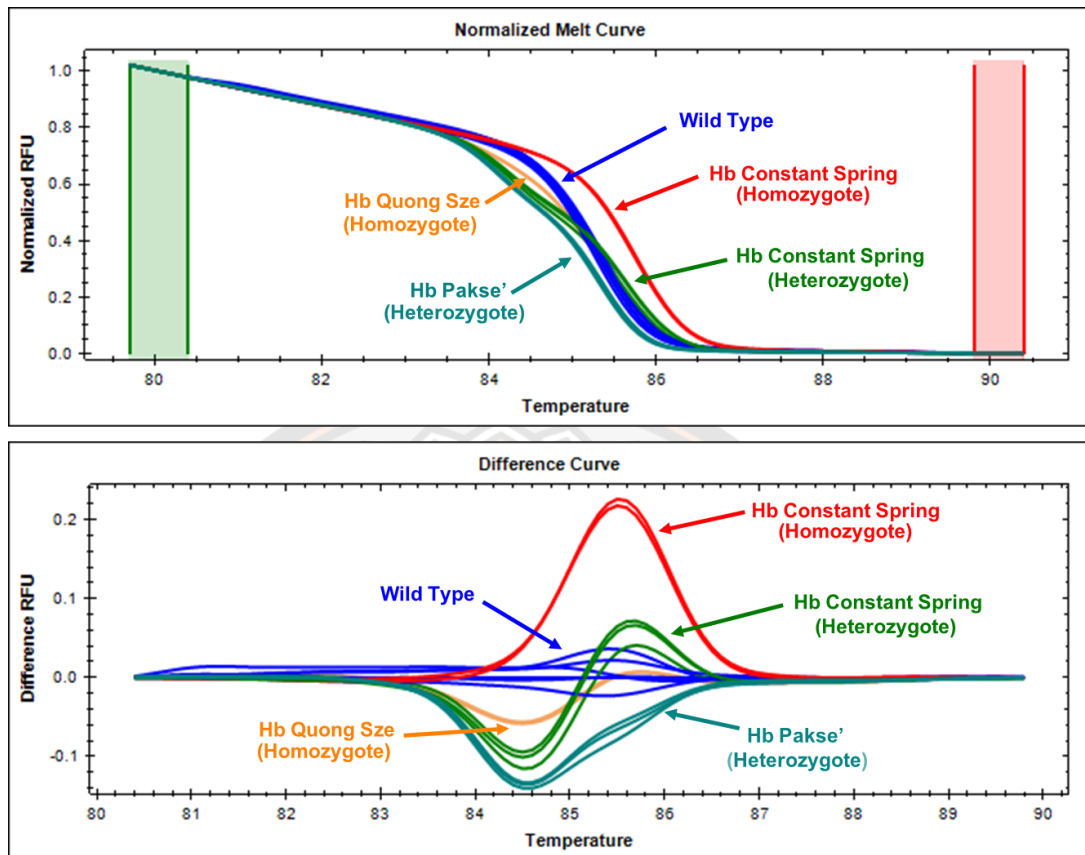
3.1 คู่ไพรเมอร์ CSF/CSR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ HRM analysis พบลักษณะรูปร่างของ Normalized melting curve และ Difference curve ที่แตกต่างกัน เป็น 5 กลุ่ม อย่างชัดเจน สามารถแบ่งออกเป็น กลุ่มตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติ (Wild-type, แสดงด้วยสีน้ำเงิน) และตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งชนิด Hb Constant Spring ในรูปแบบ Homozygote (สีแดง), Hb Constant Spring ในรูปแบบ Heterozygote (สีเขียว), Hb Pakse' (สีเขียวอ่อน) และ Hb Quong Sze (สีส้ม) มีค่าอุณหภูมิที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสี SYTO™ 9 จากทุกตัวอย่างของ ดีเอ็นเอจะอยู่ที่ 82.8-84.4 องศาเซลเซียส จากการทดลองที่มีการเติม และไม่เติม Q-Solution ดังภาพ 26 และ 27 ตามลำดับ



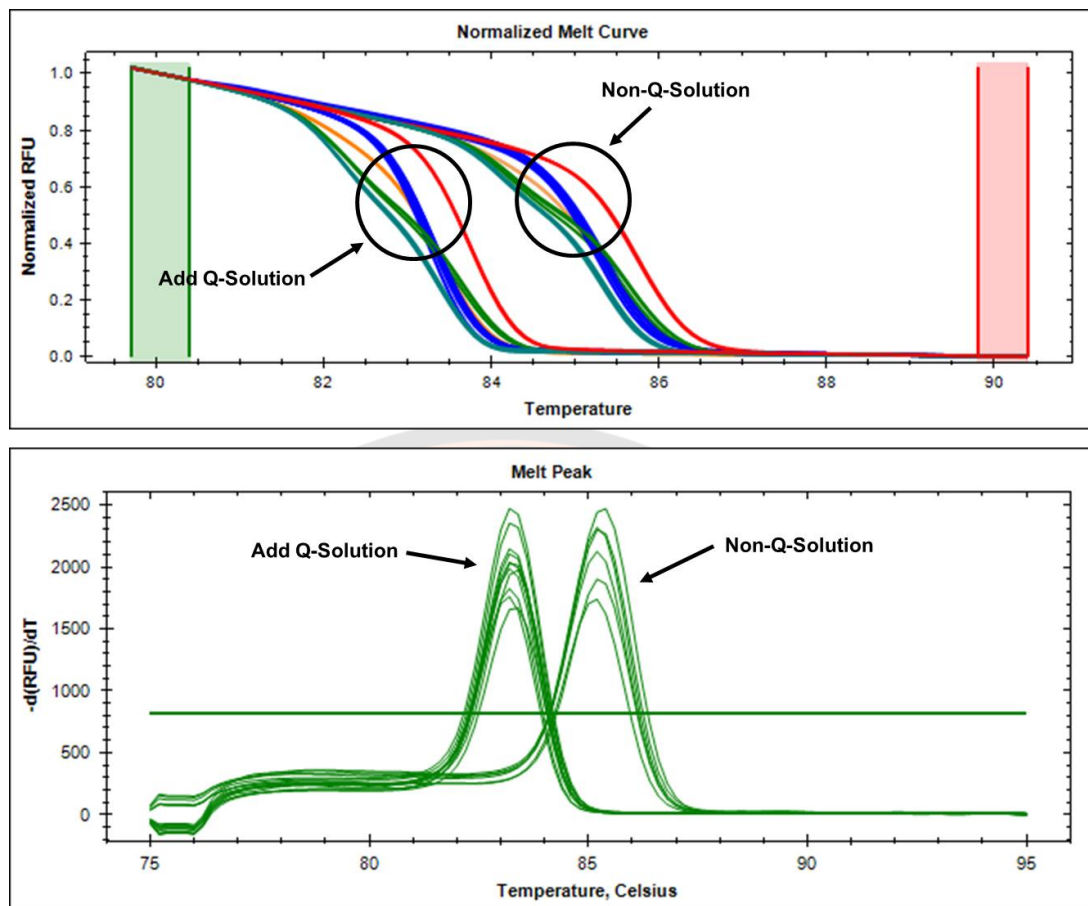
ภาพ 26 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่ไพรเมอร์ CSF/CSR ที่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีน้ำเงิน), Homozygous Hb Constant Spring (สีแดง), Heterozygous Hb Constant Spring (สีเขียว), Hb Pakse' (สีเขียวอ่อน) และ Hb Quong Sze (สีส้ม)



ภาพ 27 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่อุปกรณ์ CSF/CSR ที่ไม่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีน้ำเงิน), Homozygous Hb Constant Spring (สีแดง), Heterozygous Hb Constant Spring (สีเขียว), Hb Pakse' (สีเขียวอ่อน) และ Hb Quong Sze (สีส้ม)

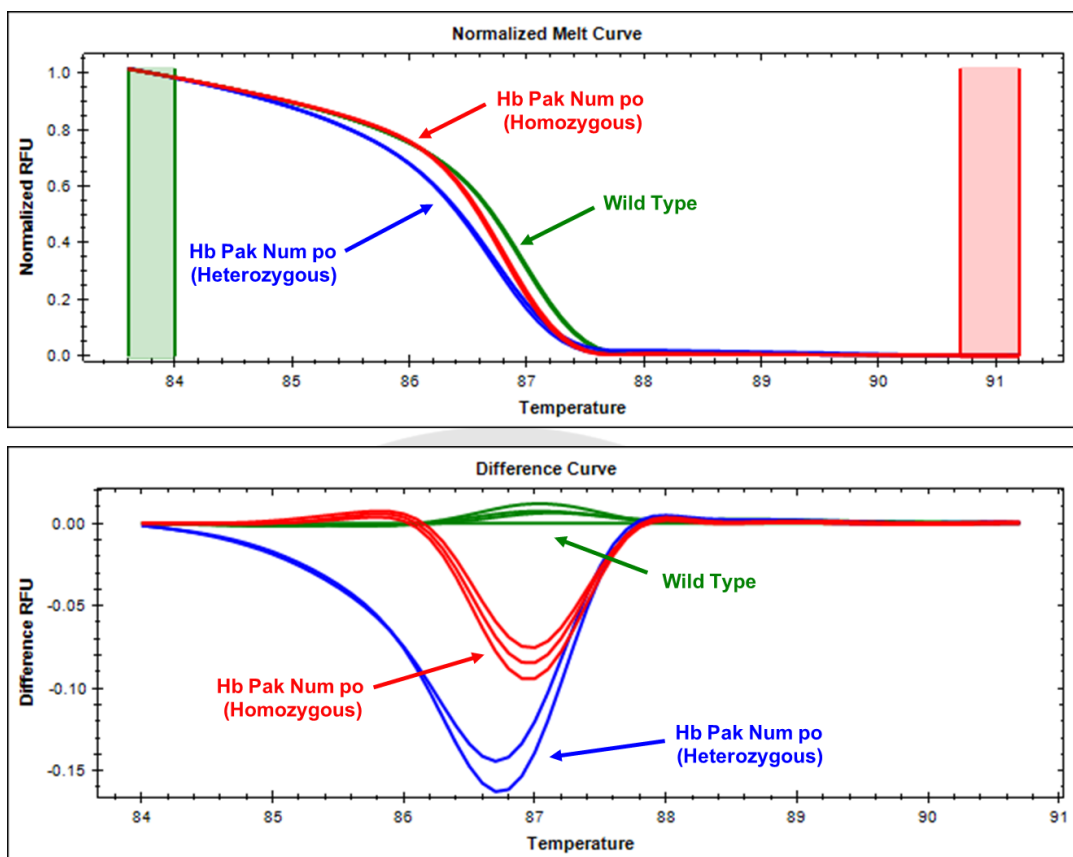
เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบการเติมและไม่เติม Q-Solution พบว่า การเติม Q-Solution ช่วยลดค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของผลผลิต PCR ลง แต่ไม่พบความแตกต่างในแง่ประสิทธิภาพหรือช่วยไขแยกความแตกต่างในแต่ละจีโนไทป์ได้อย่างชัดเจน ดังภาพ 28



ภาพ 28 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง)
เปรียบเทียบการเติมและไม่เติม Q-Solution จากคู่มือ CSF/CSR

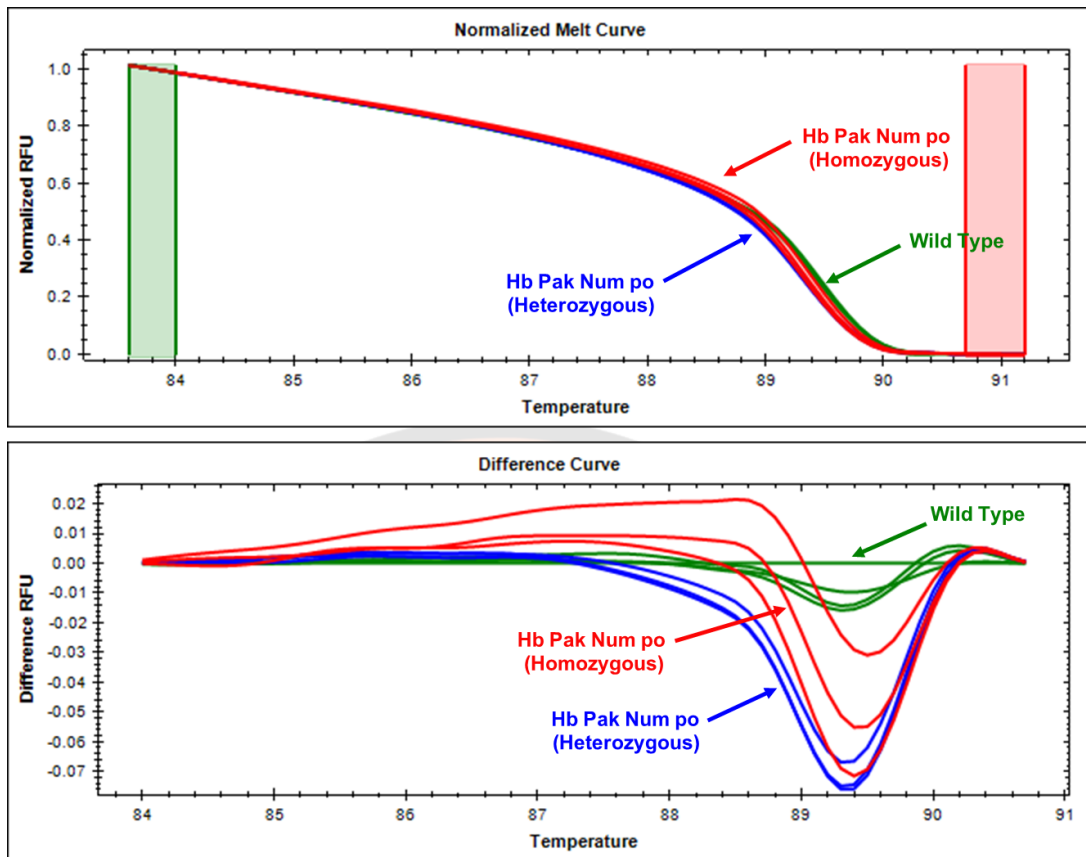
3.2 คู่มือ E5F/E5R

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ HRM analysis พบลักษณะรูปร่างของ Normalized melting curve และ Difference curve ที่แตกต่างกัน เป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน สามารถแบ่งออกเป็น กลุ่มตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติ (Wild-type, แสดงด้วยสีเขียว) กับตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Pak Num Po ในรูปแบบ Homozygote (สีแดง) และ ในรูปแบบ Heterozygote (สีน้ำเงิน) มีค่าอุณหภูมิที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของ SYTO™ 9 จากทุกตัวอย่างของดีเอ็นเอจะอยู่ที่ 85-88 องศาเซลเซียส จากการทดลองที่มีการเติม และไม่เติม Q-Solution ดังภาพ 29



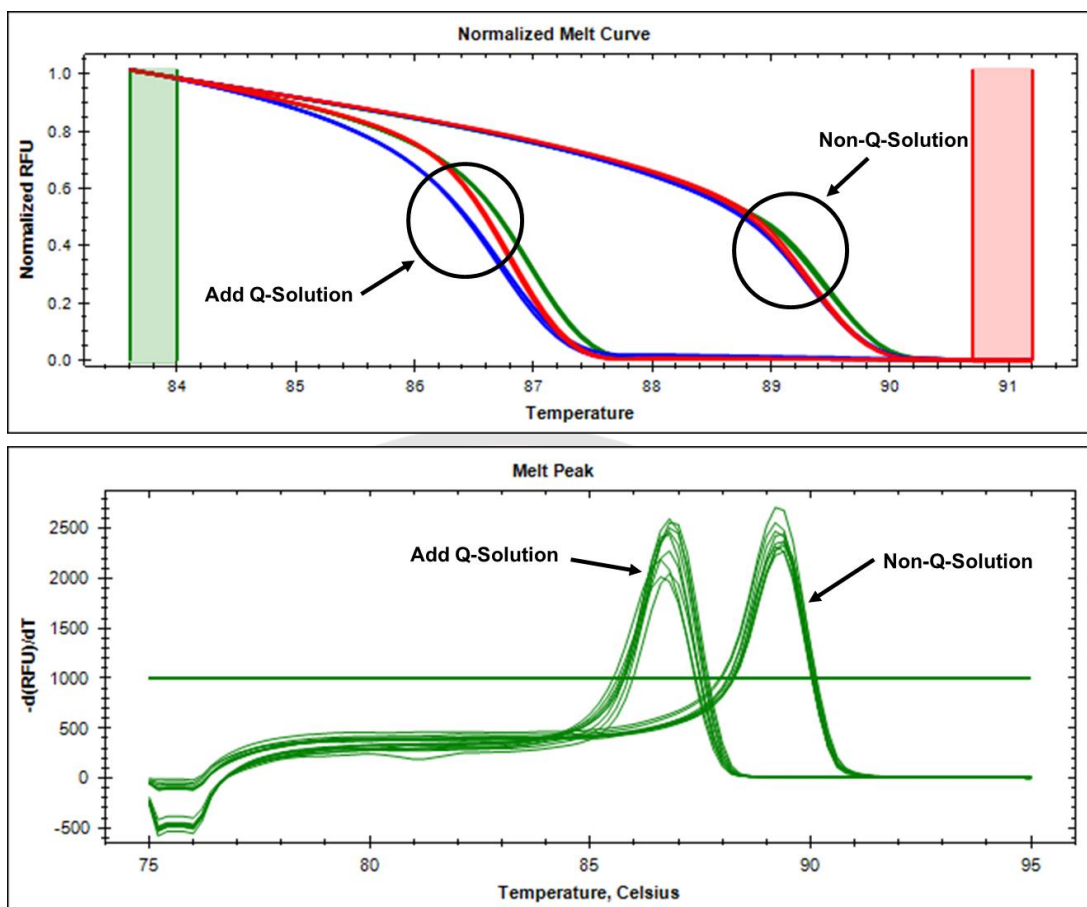
ภาพ 29 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง) จากการวิเคราะห์เทคนิค HRM ด้วยคู่มือ E5F/E5R ที่มีการเติม Q-Solution; Wild-type (สีเขียว), Homozygous Hb Pak Num Po (สีแดง) และ Heterozygous Hb Pak Num Po (สีน้ำเงิน)

จากการศึกษาการไม่เติม Q-Solution ร่วมด้วยในปฏิกิริยา เมื่อทำการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค HRM analysis จากคู่มือ E5F/E5R พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างชนิด Hb Pak Num Po ในรูปแบบ Homozygote (สีแดง) และ ในรูปแบบ Heterozygote (สีน้ำเงิน) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังภาพ 30 และการเติม Q-Solution จะยังช่วยลดช่วยเพิ่มความไว (sensitivity) และลดค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของผลผลิต PCR ลง เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติม Q-Solution ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของทั้ง 3 จีโนไทป์ ออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ดังภาพ 31



ภาพ 30 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Difference curve (ภาพล่าง)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ด้วยคู่มือ E5F/E5R ที่ไม่มีการเติม Q-Solution;
 Wild-type (สีเขียว), Homozygous Hb Pak Num Po (สีแดง) และ
 Heterozygous Hb Pak Num Po (สีน้ำเงิน)



ภาพ 31 Normalized melting curve (ภาพบน) และ Melt peak (ภาพล่าง)
เปรียบเทียบการเติม และไม่เติม Q-Solution จากคู่มือ E5F/E5R

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค HRM analysis กับเทคนิค DNA sequencing

จากผลการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทป์ของตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยวิธี DNA sequencing พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกับรูปแบบของ Melting curve ที่ได้จากการตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis สามารถระบุความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์ที่อยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยได้แสดงรูปแบบและผล DNA Sequencing ดังตาราง 9

ทุกตัวอย่างการทดลองให้ผลสอดคล้องกับผล DNA Sequencing โดยพบจีโนไทป์ของแต่ละชนิดการกลายพันธุ์ทั้งในรูปแบบ Heterozygote และ Homozygote นอกจากนี้ยังพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟามากกว่า 1 ชนิด ในผู้ป่วยรายเดียวกัน คือพบ Hb Q-Thailand ร่วมกับ Hb Constant Spring ซึ่งจะแสดงผลการทดลอง ดังต่อไป

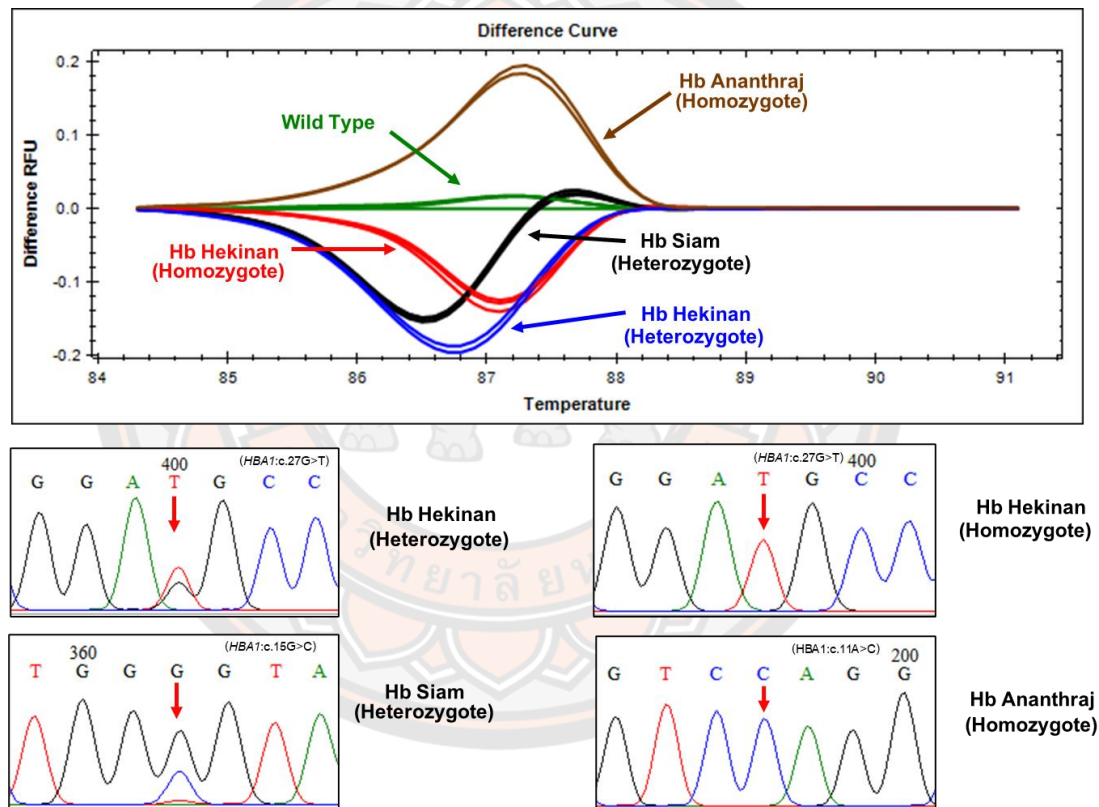
ตาราง 9 ชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติ และเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องจากการตรวจด้วย
เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis เปรียบเทียบกับวิธี DNA Sequencing

ฮีโมโกลบินผิดปกติ	ผล DNA Sequencing	เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง*
1. Hb Constant Spring (Heterozygote)	CAA/TAA	100% (8/8)
Hb Constant Spring (Homozygote)	CAA/CAA	100% (13/13)
2. Hb Pakse' (Heterozygote)	TAT/TAA	100% (3/3)
3. Hb Quang Sze (Homozygote)	CCG/CCG	100% (1/1)
4. Hb Q-Thailand (Heterozygote)	CAC/GAC	100% (16/16)
Hb Q-Thailand (Homozygote)	CAC/CAC	100% (1/1)
5. Hb Hekinan (Heterozygote)	GAT/GAG	100% (1/1)
Hb Hekinan (Homozygote)	GAT/GAT	100% (2/2)
6. Hb Ananthraj (Homozygote)	CAG/CAG	100% (1/1)
7. Hb Siam (Heterozygote)	CGT/GGT	100% (1/1)
8. Hb Queens (Heterozygote)	CGG/CTG	100% (1/1)
9. Hb Nakhon Ratchasima (Heterozygote)	GTC/GCC	100% (1/1)
10. Hb Thailand (Heterozygote)	ACG/AAG	100% (1/1)
11. Hb Pak Num Po (Homozygote)	+T/+T	100% (1/1)
12. Wild type (HBA2)	-	100% (5/5)
13. Wild type (HBA2)	-	100% (5/5)
รวมตัวอย่างที่ส่ง DNA Sequencing		100% (61/61)

*จำนวนตัวอย่างที่ส่ง DNA Sequencing / สอดคล้องกับลักษณะรูปแบบของ Melting curve ที่ได้

1. ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบในบริเวณ Exon ที่ 1 ของยีนแอลฟาโกลบิน

จากการตรวจหาการกลายพันธุ์ในบริเวณ Exon ที่ 1 ของทั้งยีนแอลฟาโกลบิน 2 และแอลฟาโกลบิน 1 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ E1F/E1R สามารถระบุชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติได้ 3 ชนิด คือ Hb Hekinan (HBA1:c.27G>T) จำนวน 3 ตัวอย่าง แบ่งเป็น จีโนไทป์แบบ Heterozygote 1 ตัวอย่าง และ Homozygote 2 ตัวอย่าง, Hb Siam (HBA1:c.15G>C) พบจีโนไทป์รูปแบบ Heterozygote 1 ตัวอย่าง และ Hb Ananthraj (HBA1 or HBA2:c.34A>C) จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่ขึ้นมาในรูปแบบ Homozygote 1 ตัวอย่าง ซึ่งทุกตัวอย่างยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทป์ด้วยเทคนิค DNA Sequencing ดังภาพ 32



ภาพ 32 ผล DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Hekinan, Hb Siam และ Hb Ananthraj เปรียบเทียบกับ Difference curve จากการวิเคราะห์เทคนิค HRM โดยใช้คู่ไพรเมอร์ E1F/E1R

Hb Hekinan จัดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Nonpathological hemoglobinopathy ที่พบมากในกลุ่มคนญี่ปุ่น และจีน เกิดจากกลายพันธุ์บนยีนแอลฟาโกลบิน 1 ปริมาณที่สังเคราะห์ได้ จึงน้อยกว่าฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นที่เกิดบนยีนแอลฟาโกลบิน 2 (คณะกรรมการการจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ, 2556) ตำแหน่งของ Hb Hekinan จะใกล้เคียงกับตำแหน่ง (Peak) ของ Hb A และ Hb A₂ จากตัวอย่างเลือด ที่ทำการวิเคราะห์ผล Hb typing ด้วยเทคนิค HPLC พบ Hb Hekinan 2 ตำแหน่ง ที่ค่า RT เท่ากับ 2.31 และ 3.48 นาที ตามลำดับ ดังภาพ 37 ในภาคผนวก ข และจากผล Melting curve ตรวจพบ จีโนไทป์ในรูปแบบ Homozygote จำนวน 2 ตัวอย่าง (จาก Hb Hekinan ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง) เนื่องจากการมีพาหะของแอลฟาซีโรธาลัสซีเมียชนิด SEA ร่วมด้วย มีการรายงานพบว่า Hb Hekinan สามารถเกิดร่วมกับ Hb E และหากมีภาวะของแอลฟาธาลัสซีเมียร่วมด้วย ส่งผลให้ โปรตีนแอลฟาโกลบินปกติสังเคราะห์ได้น้อยลง จึงอาจพบ Abnormal peak คือ Hb Hekinan ($\alpha^{\text{HK}}_2\beta^{\text{A}}$) และ Hb E-Hekinan ($\alpha^{\text{HK}}_2\beta^{\text{E}}$) ซึ่งแยกออกจาก Hb A และ Hb E อย่างชัดเจน (Fucharoen, Changtrakun, Ratanasiri, Fucharoen, & Sanchaisuriya, 2003)

สำหรับตัวอย่าง Hb Hekinan ที่พบจีโนไทป์ในรูปแบบ Heterozygote (1 ตัวอย่าง) เมื่อพิจารณาถึงผล Chromatogram กลับไม่พบ Abnormal peak ของ Hb Hekinan ที่บริเวณ ใกล้เคียงกับ Hb A และ Hb A₂ แต่พบตำแหน่งของฮีโมโกลบินผิดปกติ ที่ไม่ทราบชนิดร่วมกับตำแหน่งของ Hb F ปริมาณ 23.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า RT เท่ากับ 1.11 นาที ดังภาพที่ 38 ในภาคผนวก ข ซึ่งคาดการณ์ว่า อาจพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นร่วมอยู่ด้วย จึงได้ทำการวิเคราะห์ทุกตำแหน่งของการกลายพันธุ์ ภายในยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ด้วยเทคนิค Real-time PRC ร่วมกับ HRM analysis พบลักษณะของ Melting curve ที่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม (Wild-type) ซึ่งให้ผล Positive จากทั้งไพรเมอร์ E1F/E1R และ E4TF/E4TR แสดงให้เห็นถึงการพบการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินในบริเวณ Exon ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และทำการตรวจลำดับนิวคลีโอไทป์ด้วยเทคนิค DNA Sequencing พบการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่ง Codon 56 (HBA2:c.56 AAG>GAG) บริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 ดังภาพ 39 ในภาคผนวก ข ซึ่งจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม ต่อในอนาคต

Hb Siam และ Hb Anantharaj เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ พุ้เจริญ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่ขึ้นมา ตามลำดับ จึงไม่มีผลการรายงานชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินผิดปกติ แต่จะใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาลักษณะของ Melting curve ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปแบบของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis เพื่อเป็น

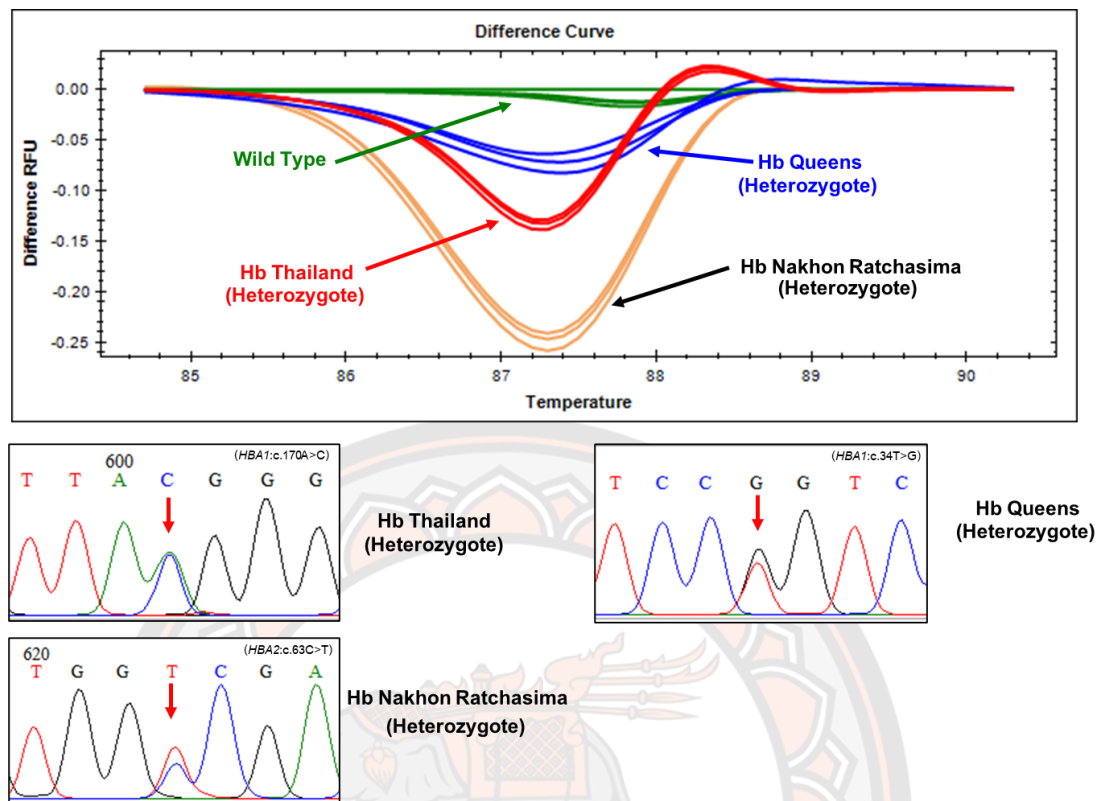
ข้อมูลสำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่อไปในอนาคต โดย Hb Siam หรือเรียกว่า Hb Ottawa จัดเป็น ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Nonpathological เช่นเดียวกับ Hb Hekinan และ Hb Queens สามารถตรวจพบ Abnormal peak ของ Hb Siam ได้ในช่วง 15-20 เปอร์เซ็นต์ การพบ Hb Siam ไม่ส่งผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา แต่ปัญหาที่สำคัญคือตำแหน่ง Peak ของ Hb Siam จะถูกแยกออกมาในตำแหน่งเดียวกับ Hb S, Hb D-Punjab, Hb Tak, Hb G-Makassar และ Hb Korle-Bu ซึ่งอาจทำให้เกิดการวินิจฉัยที่ผิดพลาดได้จำเป็นต้องได้รับการตรวจยืนยันในระดับดีเอ็นเอต่อไป (Fucharoen, Singisanan, Hama, Fucharoen, & Sanchaisuriya, 2007)

Hb Anantharaj หรือ Hb J-Wenchang-Wuming สามารถพบได้ทั้งในยีนแอลฟาโกลบิน 2 และแอลฟาโกลบิน 1 จัดเป็น Nonpathological Hb variant พบได้บ่อยในแถบประเทศจีนและมีรายงานพบได้ในประเทศไทย Hb Anantharaj มีความเป็นประจวบที่มากกว่า Hb A จึงสามารถพบ Abnormal peak ได้ในตำแหน่ง Hb Pyrgos และ Hb J-Bangkok จำเป็นต้องได้รับการตรวจยืนยันในระดับดีเอ็นเอต่อไป เช่นเดียวกัน (Srivorakun et al., 2014)

2. ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบในบริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน

จากการวิจัยสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาจำนวน 4 ชนิด จากบริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน โดยใช้คู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR และ EQF/EQR โดยแบ่งเป็น ชนิดที่พบในยีนแอลฟาโกลบิน 2 จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ Heterozygous Hb Nakhon Ratchasima (HBA2:c.63C>T) 1 ตัวอย่าง ส่วนชนิดที่พบในยีนแอลฟาโกลบิน 1 จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Heterozygous Hb Thailand (HBA1:c.170A>C) 1 ตัวอย่าง, Heterozygous Hb Queens (HBA1:c.104T>G) 1 ตัวอย่าง, Heterozygous Hb Q-Thailand (HBA1:c.223G>C) 16 ตัวอย่าง และ Homozygous Hb Q-Thailand 1 ตัวอย่าง (จากการสังเคราะห์ ซึ่งสามารถแสดงผล DNA Sequencing เปรียบเทียบกับผล Difference curve ดังภาพ 33, 34 และ 35

ตัวอย่างดีเอ็นเอของ Hb Queens และ Hb Thailand ได้รับการอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ พุ้เจริญ โดย Hb Queens (Hb Ogi) จะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ Hb Siam มากแต่แตกต่างกันตรงที่ตำแหน่งการเกิดการกลายพันธุ์ที่ Codon 34 ในขณะที่ Hb Siam เกิดที่ Codon 15 ส่วน Hb Thailand เกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง Codon ที่ 56 ทั้งสองฮีโมโกลบินผิดปกตินี้ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยา (Fucharoen et al., 2007)

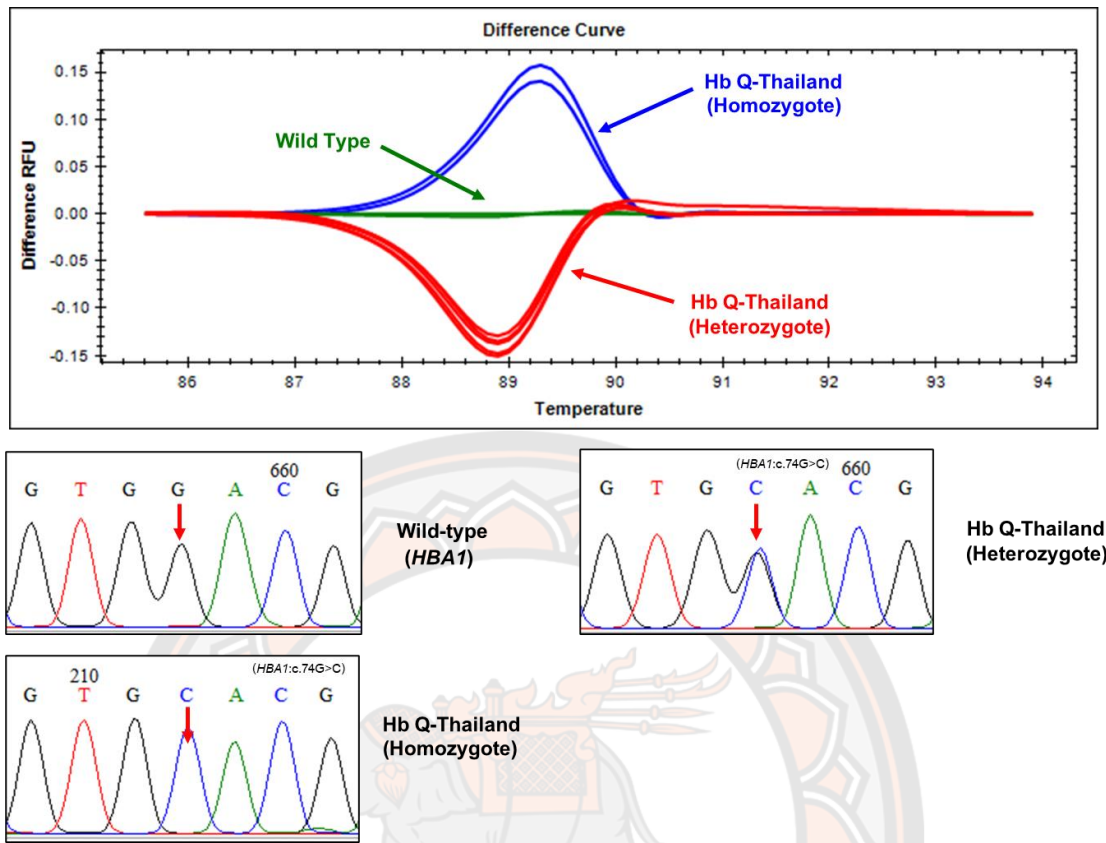


ภาพ 33 DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Thailand, Hb Queens และ Hb Nakhon Ratchasima เปรียบเทียบกับ Difference curve จากการวิเคราะห์เทคนิค HRM โดยใช้คู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR

Hb Nakhon Ratchasima มีการรายงานการค้นพบครั้งแรกที่ประเทศไทย เกิดจากการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง Codon ที่ 63 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 จัดว่าเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Nonpathological hemoglobinopathy ด้วยเช่นเดียวกัน เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน Alanine ไปเป็น Valine ซึ่งต่างก็มีคุณสมบัติเป็น Hydrophobic side chain เช่นเดียวกัน (Srivorakun et al., 2011) เมื่อพิจารณาผล Hb Typing ด้วยเทคนิค HPLC ดังภาพ 40 ในภาคผนวก ข จะพบว่า Chromatogram มีลักษณะคล้ายกับ Hb Hekinan เพราะพบ Abnormal peak ของ Hb Nakhon Ratchasima ที่บริเวณใกล้เคียงกับ Hb A และ Hb A₂ ที่ RT เท่ากับ 2.82 และ 3.85 นาที และคิดเป็นปริมาณ 23.8 และ 3.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Hb Q-Thailand เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง Codon 74 บริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 1 ร่วมกับการเกิดแอลฟาพลัสธาลัสซีเมียชนิด -4.2 kb deletion บนแขนข้างเดียวกันของโครโมโซมแท่งที่ 16 จัดเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ก่อให้เกิดความผิดปกติทั้งในด้านคุณภาพ (qualitative defect) และด้านปริมาณ (quantitative defect) การระบาดวิทยาของ Hb Q-Thailand มีรายงานการพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย (Panyasai and Pornprasert, 2014) และพบความชุกของ Heterozygous Hb Q-Thailand ได้บ่อยกว่า Homozygous Hb Q-Thailand (Panyasai and Fucharoen, 2016) ลักษณะทางคลินิกที่สำคัญของผู้ป่วยทั้งชนิดที่เป็น Heterozygous และ Homozygous Hb Q-Thailand คือ มีภาวะซีดเล็กน้อย (slight anemia) และพบเม็ดเลือดแดงขนาดเล็ก (microcytosis) การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน 2 จึงมีระดับการสังเคราะห์โกลบินโปรตีนลดลง การพบ Heterozygous Hb Q-Thailand ร่วมกับแอลฟาซีโรธาลัสซีเมีย ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า Hb Q-H disease ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ Deletional Hb H disease ทำให้พบภาวะซีดรุนแรง ตับ และม้ามโต จำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือดและใช้ยาขับเหล็ก (Leung et al., 2004)

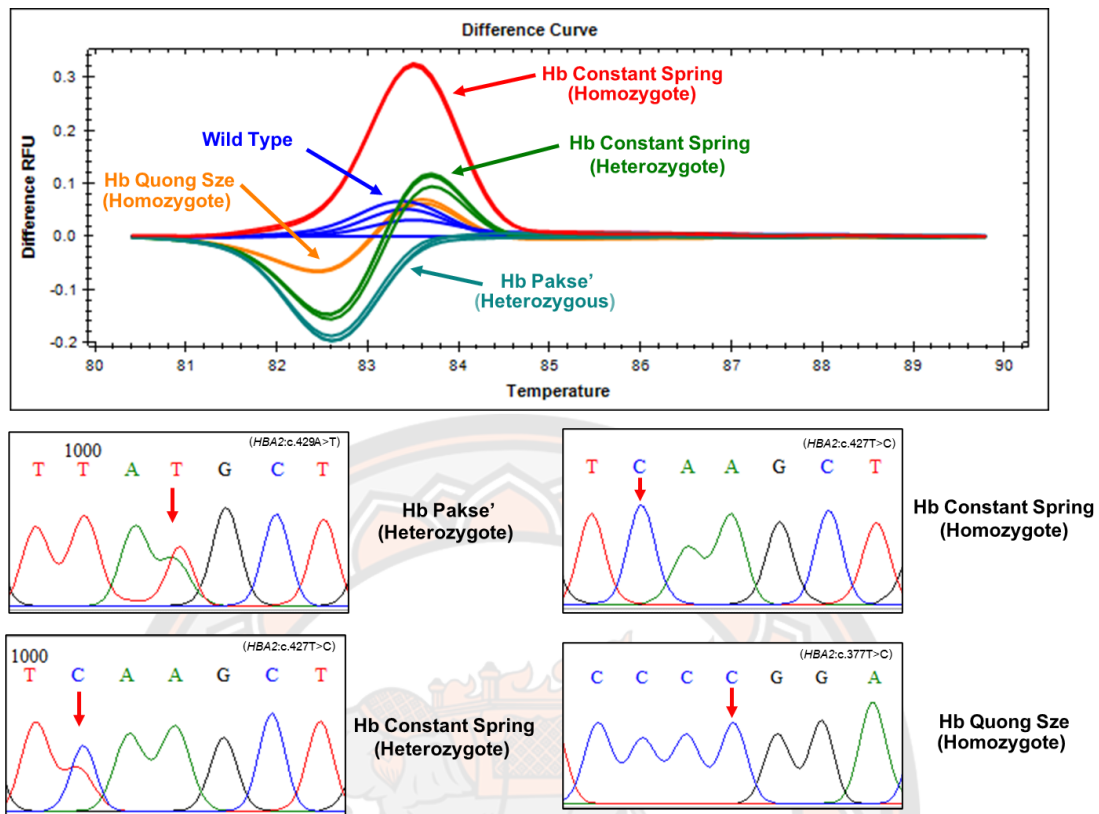
จากตัวอย่างที่ได้รับการตรวจ Hb Q-Thailand ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis พร้อมกับยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing ทั้ง 17 ตัวอย่าง สามารถแบ่ง Hb Q-Thailand ที่พบร่วมกับปีตาธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินอีผิดปกติ ออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ Hb Q-Thailand heterozygotes 6 ตัวอย่าง, Hb Q-Thailand heterozygote ร่วมกับ Heterozygous Hb Constant Spring 1 ตัวอย่าง, Hb Q-Thailand heterozygotes ร่วมกับ Heterozygous Hb E 3 ตัวอย่าง, Hb Q-Thailand heterozygotes ร่วมกับ Homozygous Hb E 2 ตัวอย่าง, Hb Q-Thailand heterozygote ร่วมกับ Hb E/ β -thalassemia 2 ตัวอย่าง และ Hb Q-Thailand heterozygotes ร่วมกับ Heterozygous β -thalassemia 2 ตัวอย่าง ในการตรวจ Hb typing ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า Hb Q-Thailand ถูกตรวจพบได้ในตำแหน่ง S-window (Jindadamrongwech, Tungbuppha, Chuncharunee, & Butthep, 2010) โดยมีค่า RT อยู่ในช่วง 4.5-4.7 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับ Hb Tak (β 146 Ter>Thr, +AC) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีรายงานการพบได้บ่อยในเขตภาคเหนือของประเทศไทย (Panyasai & Pornprasert, 2014) และมีค่า RT อยู่ในช่วง 4.0-4.3 นาที การรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติจากการวิเคราะห์ Hb typing เพียงอย่างเดียว อาจไม่เพียงพอ และเกิดความผิดพลาดได้ จากการมีค่า RT ที่ใกล้เคียงกัน รวมถึงจากการที่มีประสิทธิสัมพันธ์ร่วมกับโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่น ส่งผลให้เกิดรูปแบบของโครมาโทแกรมที่แตกต่าง ทำให้ต้องได้รับการตรวจยืนยันในระดับ DNA ต่อไป



ภาพ 34 ผล DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Q-Thailand
เปรียบเทียบกับ Difference curveจากการวิเคราะห์เทคนิค HRM
โดยใช้คู่มือ EQF/EQR

3. ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบในบริเวณ Exon ที่ 3 ของยีนแอลฟาโกลบิน

ตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาถึง 4 ชนิด จากบริเวณ Exon ที่ 3 ของยีนแอลฟาโกลบิน โดยใช้คู่มือ CSF/CSR และ E5F/E5R โดยแบ่งเป็นชนิดที่พบในยีนแอลฟาโกลบิน 2 จำนวน 3 ชนิด 4 จีโนไทป์ ได้แก่ Heterozygous Hb Constant Spring (HBA2:c.427T>C) 1 ตัวอย่าง, Homozygous Hb Constant Spring (HBA2:c.427T>C) 1 ตัวอย่าง, Heterozygous Hb Pakse' (HBA2:c.429A>T) และ Homozygous Hb Quang Sze (HBA2:c.377T>C) 1 ตัวอย่าง ส่วนชนิดที่พบในยีนแอลฟาโกลบิน 1 จำนวน 1 ชนิด คือ Homozygous Hb Pak Num Po (HBA1:c.396 ins T+) (จากการสังเคราะห์ ซึ่งสามารถแสดงผล DNA Sequencing เปรียบเทียบกับผล Difference curve ดังภาพ 35 และ 36

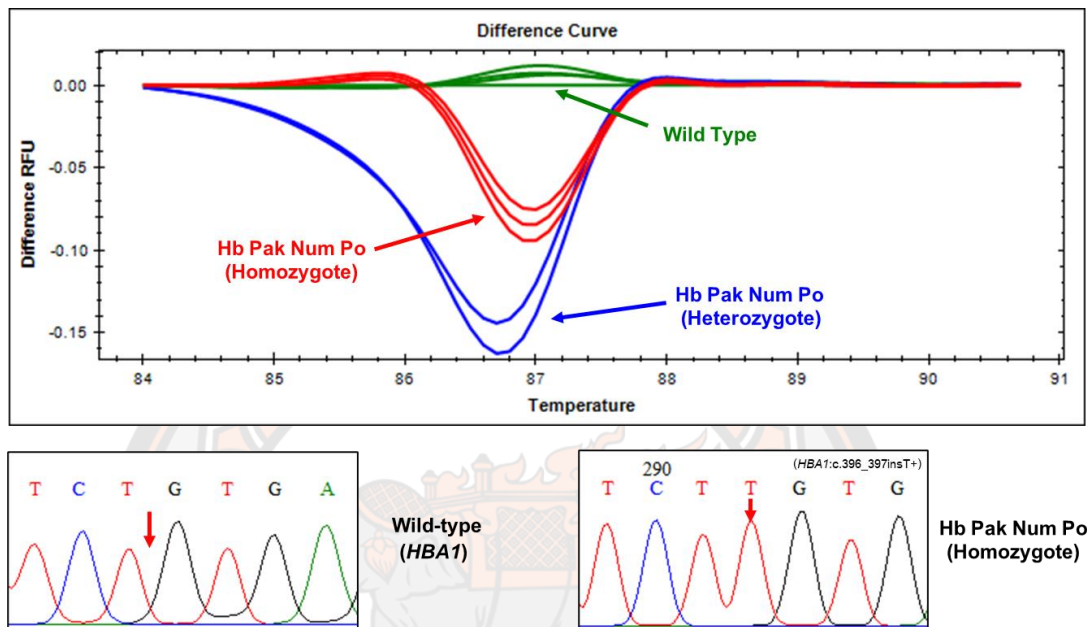


ภาพ 35 ผล DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Constant Spring Hb Pakse' และ Hb Quong Sze เปรียบเทียบกับ Difference curve จากการวิเคราะห์เทคนิค HRM โดยใช้คู่มือไพรเมอร์ CSF/CSR

Hb Constant Spring และ Hb Pakse' เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Termination ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 เกิดเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก TAA เป็น CAA และ TAA เป็น TAT ตามลำดับ ส่งผลให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนในสายแอลฟาโกลบินที่ยาวขึ้นไปอีกจำนวน 31 ตัว จัดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ และแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการขาดหายไปของยีนที่สำคัญสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับแอลฟาซีโรธาลัสซีเมีย ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า Non-deletional Hb H disease ที่มีความรุนแรงจำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการให้เลือด และใช้ยาขับเหล็ก เช่นเดียวกับ Hb Q-H disease (Pichanun et al., 2010; Sanchaisuriya et al., 2002; Singanan et al., 2007; Viprasit et al., 2002)

Hb Quong Sze (HBA2: c.377T>C) จัดเป็น Non-deletional thalassemia เช่นเดียวกับ Hb Constant Spring และ Hb Pakse' การมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกับแอลฟาซีโรธาลัสซีเมียก่อให้เกิดโรค Non-deletional Hb H อันเนื่องมาจากความไม่เสถียรภาพของสายโปรตีนแอลฟาโกลบิน ทำให้เกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็ว (Yang, Lou, Liu, He, & Li, 2014)

Hb Pak Num Po เกิดจากการ Insertion ของเบส T ที่ตำแหน่ง Codon 131 ทำให้เกิดการสังเคราะห์สายโปรตีนแอลฟาโกลบินต่อไปอีก 34 กรดอะมิโน จากความไม่เสถียรภาพของสายโปรตีนแอลฟาโกลบิน และเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน (Viprakasit et al., 2004)



ภาพ 36 ผล DNA Sequencing ระบุชนิดการกลายพันธุ์ของ Hb Pak Num Po เปรียบเทียบกับ Difference curve จากการวิเคราะห์เทคนิค HRM โดยใช้คู่มือ E5F/E5R

การตรวจยืนยันชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติในระดับดีเอ็นเอมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการแปลผลเพื่อกำหนดความเสี่ยงที่อาจให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง รวมไปถึงการวางแผนการรักษาผู้ป่วยในอนาคต เนื่องจากฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาสามารถพบร่วมกับโรคธาลัสซีเมียและก่อให้เกิดโรคโลหิตจางที่มีอาการรุนแรง ในขณะที่บางชนิดไม่ส่งผลการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา ดังสรุปในตารางที่ 10 การเลือกใช้เทคนิคในการวิเคราะห์หรือวิธีการตรวจยืนยันที่รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ จะมาสามารถช่วยลดขั้นตอนในการวินิจฉัย โดยเฉพาะการตรวจยืนยันฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis มีความถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี DNA Sequencing อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และอาจนำไปใช้ในการตรวจยืนยันฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย

ตาราง 10 ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา และรายงานการก่อโรค

ฮีโมโกลบินผิดปกติ	การก่อโรค
1. Hb Constant Spring	สามารถพบร่วมกับ α -thalassemia 1 ก่อให้เกิดโรค Hb H-CS disease ที่มีอาการรุนแรงได้ (Charoenkwan, Taweephon, Sae-Tung, Thanarattanakorn, & Sanguansermsri, 2005)
2. Hb Pakse'	สามารถพบร่วมกับ α -thalassemia 1 ก่อให้เกิดโรค Hb H-Pakse' disease ที่มีอาการรุนแรงได้ (Sanchaisuriya et al., 2002)
3. Hb Quong Sze	สามารถพบร่วมกับ α -thalassemia 1 ก่อให้เกิดโรค Hb H disease ที่มีอาการรุนแรงได้ (Wee, Tan, Chua, George, & Tan, 2009)
4. Hb Q-Thailand	สามารถพบร่วมกับ α -thalassemia 1 ก่อให้เกิดโรค Hb Q-H disease ที่มีอาการรุนแรงได้ (Leung et al., 2004)
5. Hb Pak Num Po	สามารถพบร่วมกับ α -thalassemia 1 ก่อให้เกิดโรค Hb H disease ที่มีอาการรุนแรงได้ (Viprakasit et al., 2004)
6. Hb Hekinan	ไม่พบความผิดปกติ ¹
7. Hb Ananthraj	ไม่พบความผิดปกติ ¹
8. Hb Siam	ไม่พบความผิดปกติ ¹
9. Hb Queens	ไม่พบความผิดปกติ ¹
10. Hb Nakhon Ratchasima	ไม่พบความผิดปกติ ¹
11. Hb Thailand	ไม่พบความผิดปกติ ¹

¹(คณะกรรมการการจัดทำคู่มือปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ, 2556)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ในการระบุการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาที่พบได้บ่อยในประเทศไทยด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดการกลายพันธุ์ โดยได้เปรียบเทียบความถูกต้องของการวิเคราะห์กับวิธี DNA sequencing ซึ่งสามารถสรุปผลการวิจัยได้ 5 หัวข้อ ดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองและการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ประกอบไปด้วยตัวอย่างเลือดชนิด Whole blood และตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาจากหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 11 ชนิด ดังตาราง 6 ผลการทดลองจากการสกัดดีเอ็นเอ และทำการตรวจวัดปริมาณคุณภาพของการสกัดที่ได้พบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ที่ 33.72 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร อัตราส่วนระหว่าง A₂₆₀ ต่อ A₂₈₀ เฉลี่ยอยู่ที่ 1.79 บ่งบอกถึงคุณภาพดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้ศึกษาอย่างขั้นตอนต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ด้วยเทคนิค PCR

คูไพรเมอร์ และ HBA_T1/HBA2_T3 และ HBA_T1/HBA1_T2 สามารถเข้าจับกับบริเวณของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ตามลำดับ อย่างจำเพาะเจาะจง เมื่อใช้อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส และสามารถให้ผลผลิต PCR ที่ได้จากคูไพรเมอร์ 2 คู่นี้สำหรับเป็น Template ในการวิเคราะห์ขั้นตอน Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis และนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับของนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing ได้

3. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM analysis

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะมีความจำเพาะในแต่ละ Exon ของ ยีนแอลฟาโกลบิน ซึ่งแต่ละคู่จะครอบคลุมตำแหน่งการกลายพันธุ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟา สามารถแบ่งออกเป็น

3.1 กลุ่มไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 1 ของยีนแอลฟาโกลบิน

ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ E1F/E1R และ E12F/E12R สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอได้ทั้ง บริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้คือ Hb Ananthraj, Hb Hekinan และ Hb Siam

3.2 กลุ่มไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน

ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ E4TF/E4TR และ EQF/EQR สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอได้ทั้ง บริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2 และยีนแอลฟาโกลบิน 1 ได้เช่นเดียวกัน ชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้คือ Hb Q-Thailand, Hb Thailand, Hb Nakhon Ratchasima และ Hb Queens

3.3 กลุ่มไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ Exon ที่ 3 ของยีนแอลฟาโกลบิน

ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ CSF/CSR ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 2 ได้เพียงตำแหน่งเดียว และคู่ไพรเมอร์ E5F/E5R สำหรับเข้าจับกับบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน 1 ชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้คือ Hb Constant Spring, Hb Pakse', Hb Quong Sze, Hb Queens และ Hb Pak Num Po

4. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของคู่ไพรเมอร์ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing อยู่ในช่วง 58-60 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าจับกันระหว่างไพรเมอร์กับ Template และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมอยู่ที่ 1.5 มิลลิโมลลาร์

สำหรับการตรวจฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาได้มีการเติมน้ำสำเร็จรูป Q-Solution จาก Qiagen (Hilden, Germany) ทำให้การแยกความแตกต่างของแต่ละจีโนไทป์ได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น และช่วยลดค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของผลผลิต PCR ลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติม Q-Solution

5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis กับเทคนิค DNA sequencing

จากผลการทดสอบ พบว่าทุกตัวอย่างของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดแอลฟาได้ส่งยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing พบว่าทุกรูปแบบของ Melting curve ที่ได้จากการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis ให้ผลสอดคล้อง และตรงกับผล DNA sequencing ซึ่งสามารถนำมาคำนวณความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ จากทุกตัวอย่าง นับได้ว่า เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจยืนยันการกลายพันธุ์ได้อย่าง ถูกต้องแม่นยำ อีกทั้งยังช่วยลดขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์ และเหมาะสมในการนำมาพัฒนา เพื่อใช้ในการตรวจสำหรับงานควบคุมป้องกันโรคธาลัสซีเมียอีกด้วย



บรรณานุกรม

- คณะกรรมการการเจ้าหน้าที่ปฏิบัติกรตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ. (2556). คู่มือปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ. นนทบุรี: ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- Abramov, A., Lehmann, H., & Robb, L. (1980). Hb Shaare Zedek (alpha 56 E5 Lys leads to Glu). *FEBS Lett*, *113*(2), 235-237. doi:10.1016/0014-5793(80)80599-0
- Boonsa, S., Sanchaisuriya, K., Fucharoen, G., Wiangnon, S., Jetsrisuparb, A., & Fucharoen, S. (2004). The diverse molecular basis and hematological features of Hb H and AEBart's diseases in Northeast Thailand. *Acta Haematol*, *111*(3), 149-154. doi:10.1159/000076523
- Cappellini, M. D., Cohen, A., Porter, J., Taher, A., & Viprakasit, V. (2014). In M. D. Cappellini, A. Cohen, J. Porter, A. Taher, & V. Viprakasit (Eds.), *Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT)*. Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation
- Chaibunruang, A., Sornkayasit, K., Chewasateanchai, M., Sanugul, P., Fucharoen, G., & Fucharoen, S. (2018). Prevalence of Thalassemia among Newborns: A Re-visited after 20 Years of a Prevention and Control Program in Northeast Thailand. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, *10*(1), e2018054-e2018054. doi:10.4084/MJHID.2018.054
- Charoenkwan, P., Taweephon, R., Sae-Tung, R., Thanarattanakorn, P., & Sanguansermisri, T. (2005). Molecular and clinical features of Hb H disease in northern Thailand. *Hemoglobin*, *29*(2), 133-140.
- Clarke, G. M., & Higgins, T. N. (2000). Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem*, *46*(8), 1284-1290.
- Dehbashi, S., Tahmasebi, H., Sedighi, P., Davarian, F., & Arabestani, M. R. (2020). Development of high-resolution melting curve analysis in rapid detection of vanA gene, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* from clinical isolates. *Trop Med Health*, *48*, 8. doi:10.1186/s41182-020-00197-9
- Farashi, S., & Hartevelde, C. L. (2018). Molecular basis of α -thalassemia. *Blood Cells*,

Molecules, and Diseases, 70, 43-53.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2017.09.004>

- Fischel-Ghodsian, N., Nicholls, R. D., & Higgs, D. R. (1987). Unusual features of CpG-rich (HTF) islands in the human alpha globin complex: association with non-functional pseudogenes and presence within the 3' portion of the zeta gene. *Nucleic acids research*, 15(22), 9215-9225. doi:10.1093/nar/15.22.9215
- Fucharoen, S., Changtrakun, Y., Ratanasiri, T., Fucharoen, G., & Sanchaisuriya, K. (2003). Complex interaction of Hb Hekinan [alpha27(B8) Glu-Asp] and Hb E [beta26(B8) Glu-Lys] with a deletional alpha-thalassemia 1 in a Thai family. *Eur J Haematol*, 70(5), 304-309. doi:10.1034/j.1600-0609.2003.00049.x
- Fucharoen, S., Singanan, S., Hama, A., Fucharoen, G., & Sanchaisuriya, K. (2007). Rapid molecular characterization of Hb Queens and Hb Siam: two variants easily misidentified as sickle Hb. *Clin Biochem*, 40(1-2), 137-140. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.08.008
- Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Reed, G. H., Pryor, R. J., Chen, J., & Wittwer, C. T. (2003). Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem*, 49(3), 396-406. doi:10.1373/49.3.396
- Harris, S., & Jones, D. B. (1997). Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci*, 54(3), 166-173.
- Holden, J. A., Willmore-Payne, C., Coppola, D., Garrett, C. R., & Layfield, L. J. (2007). High-resolution melting amplicon analysis as a method to detect c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol*, 128(2), 230-238. doi:10.1309/7teh56k6wwwxennqy
- Jensen, M. A., Fukushima, M., & Davis, R. W. (2010). DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One*, 5(6), e11024. doi:10.1371/journal.pone.0011024
- Jindadamrongwech, S., Tungbuppha, N., Chuncharunee, S., & Butthep, P. (2010). Hb Tak and Hb Q-Thailand in Thai patients are S-window hemoglobin variants revealed by high performance liquid chromatography. *Hemoglobin*, 34(2), 161-164.

doi:10.3109/03630261003679631

- Kulaphisit, M., Kampuansai, J., Leecharoenkiat, K., Wathikthinnakon, M., Kangwanpong, D., Munkongdee, T., . . . Lithanatudom, P. (2017). A comprehensive ethnic-based analysis of alpha thalassaemia allele frequency in northern Thailand. *Sci Rep*, 7(1), 4690. doi:10.1038/s41598-017-04957-2
- Laochinchat, P., & Jindadamrongwech, S. (2017). *Screening for rare and novel α -globin gene mutations by high resolution melting analysis*.
- Laosombat, V., Wirryasateinkul, A., Chrangtrakul, Y., & Fucharoen, S. (2003). Rapid detection of an α thalassaemia variant (Hb Quong Sze). *Haematologica*, 88(7), E127.
- Le Tri, N., Nguyen-Dien, G. T., Dang, A. T. L., Bao, N. T., Tinh, H. T., & Nguyen, H. T. (2016). Optimizing a multiplex high resolution melting curve to diagnose G6PD deficiency based on viangchan and canton mutations. *Biomedical Research and Therapy*, 3(8), 36. doi:10.7603/s40730-016-0036-2
- Leung, K. F., Ma, E. S., Chan, A. Y., & Chan, L. C. (2004). Clinical phenotype of haemoglobin Q-H disease. *J Clin Pathol*, 57(1), 81-82. doi:10.1136/jcp.57.1.81
- Lithanatudom, P., Khampan, P., Smith, D. R., Svasti, S., Fucharoen, S., Kangwanpong, D., & Kampuansai, J. (2016). The prevalence of alpha-thalassaemia amongst Tai and Mon-Khmer ethnic groups residing in northern Thailand: A population-based study. *Hematology*, 21(8), 480-485. doi:10.1080/10245332.2016.1148374
- Martyn, G. E., Quinlan, K. G. R., & Crossley, M. (2017). The regulation of human globin promoters by CCAAT box elements and the recruitment of NF-Y. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1860(5), 525-536. doi:10.1016/j.bbagr.2016.10.002
- Old, J., & Henderson, S. (2010). Molecular diagnostics for haemoglobinopathies. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 4(3), 225-240. doi:10.1517/17530051003709729
- Panyasai, S., Fucharoen, G., & Fucharoen, S. (2016). Hemoglobin Variants in Northern Thailand: Prevalence, Heterogeneity and Molecular Characteristics. *Genet Test Mol Biomarkers*, 20(1), 37-43. doi:10.1089/gtmb.2015.0182
- Panyasai, S., & Pornprasert, S. (2014). Hemoglobin Q-Thailand and its combinations with other forms of thalassaemia or hemoglobinopathies in northern Thailand. *Clin*

- Lab*, 60(7), 1099-1103. doi:10.7754/clin.lab.2013.130513
- Pichanun, D., Munkongdee, T., Klamchuen, S., Butthep, P., Winichagoon, P., Fucharoen, S., & Svasti, S. (2010). Molecular screening of the Hbs Constant Spring (codon 142, TAA>CAA, $\alpha 2$) and Paksé (codon 142, TAA>TAT, $\alpha 2$) mutations in Thailand. *Hemoglobin*, 34(6), 582-586. doi:10.3109/03630269.2010.526914
- Sanchaisuriya, K., Fucharoen, G., & Fucharoen, S. (2002). Hb Paksé [($\alpha 2$) codon 142 (TAA-->TAT or Term-->Tyr)] in Thai patients with EAbart's disease and Hb H Disease. *Hemoglobin*, 26(3), 227-235. doi:10.1081/hem-120015026
- Shih, H. C., Er, T. K., Chang, T. J., Chang, Y. S., Liu, T. C., & Chang, J. G. (2010). Development of a high-resolution melting method for the detection of hemoglobin alpha variants. *Clin Biochem*, 43(7-8), 671-676. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.01.011
- Singsanan, S., Fucharoen, G., Savongsy, O., Sanchaisuriya, K., & Fucharoen, S. (2007). Molecular characterization and origins of Hb Constant Spring and Hb Paksé in Southeast Asian populations. *Ann Hematol*, 86(9), 665-669. doi:10.1007/s00277-007-0310-x
- Smith, G. D., Chadwick, B. E., Willmore-Payne, C., & Bentz, J. S. (2008). Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in cytology specimens from patients with non-small cell lung cancer utilising high-resolution melting amplicon analysis. *J Clin Pathol*, 61(4), 487-493. doi:10.1136/jcp.2007.051425
- Somerville, T. (2001). Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 94(11), 602-603.
- Srivorakun, H., Fucharoen, G., Puangplruk, R., Kheawon, N., & Fucharoen, S. (2011). Complex interaction of hemoglobin (Hb) Nakhon Ratchasima [$\alpha 63$ (E12)Ala→Val], a novel $\alpha 2$ -globin chain variant with Hb E [$\beta 26$ (B8)Glu→Lys] and a deletional $\alpha (+)$ -thalassemia. *Eur J Haematol*, 87(1), 68-72. doi:10.1111/j.1600-0609.2011.01616.x
- Srivorakun, H., Singha, K., Fucharoen, G., Sanchaisuriya, K., & Fucharoen, S. (2014). A large cohort of hemoglobin variants in Thailand: molecular epidemiological study and diagnostic consideration. *PLoS One*, 9(9), e108365.

doi:10.1371/journal.pone.0108365

Stamatoyannopoulos, G. (2005). Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol*, 33(3), 259-271.

doi:10.1016/j.exphem.2004.11.007

Sun, W., Li, J. J., Xiong, C., Zhao, B., & Chen, S. L. (2016). The Potential Power of Bar-
HRM Technology in Herbal Medicine Identification. *Front Plant Sci*, 7, 367.

doi:10.3389/fpls.2016.00367

Sura, T., Trachoo, O., Viprakasit, V., Vathesatogkit, P., Tunteeratum, A., Busabaratana, M., . . . Isarangkura, P. (2007). Hemoglobin H disease induced by the common SEA deletion and the rare hemoglobin Quong Sze in a Thai female: longitudinal clinical course, molecular characterization, and development of a PCR/RFLP-based detection method. *Ann Hematol*, 86(9), 659-663. doi:10.1007/s00277-007-0303-9

Suwannasing, S., Sroymora, S., & Jindadamrongwech, S. (2016). Screening for Uncommon Nondeletional α -Globin Gene Mutations Causing Severe Hb H Disease in a Thai Population Using High Resolution Melting Analysis. *J Hematol Transfus Med* 2016;26:365-72.

Taher, A., Vichinsky, E., Musallam, K., Cappellini, M. D., & Viprakasit, V. (2013). In D. Weatherall (Ed.), *Guidelines for the Management of Non Transfusion Dependent Thalassaemia (NTDT)*. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation

Thein, S. L. (2018). Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*, 70, 54-65. doi:10.1016/j.bcmd.2017.06.001

Uaprasert, N., Settapiboon, R., Amornsiriwat, S., Sutcharitchan, P., & Rojnuckarin, P. (2017). The first validated criteria for effective screening and a new simplified method for α -globin gene sequencing for diagnosis of uncommon α -globin mutations. *Int J Hematol*, 105(6), 819-827. doi:10.1007/s12185-017-2186-4

Viprakasit, V., & Ekwattanakit, S. (2018). Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 32(2), 193-211.

doi:10.1016/j.hoc.2017.11.006

Viprakasit, V., Ekwattanakit, S., Chalaow, N., Riolueang, S., Wijit, S., Tanyut, P., . . .

- Tachavanich, K. (2014). Clinical presentation and molecular identification of four uncommon alpha globin variants in Thailand. Initiation codon mutation of $\alpha 2$ -globin Gene (HBA2:c.1delA), donor splice site mutation of $\alpha 1$ -globin gene (IVSI-1, HBA1:c.95 + 1G>A), hemoglobin Queens Park/Chao Pra Ya (HBA1:c.98T>A) and hemoglobin Westmead (HBA2:c.369C>G). *Acta Haematol*, 131(2), 88-94.
doi:10.1159/000353119
- Viprakasit, V., Tanphaichitr, V. S., Pung-Amritt, P., Petrarat, S., Suwantol, L., Fisher, C., & Higgs, D. R. (2002). Clinical phenotypes and molecular characterization of Hb H-Paksé disease. *Haematologica*, 87(2), 117-125.
- Viprakasit, V., Tanphaichitr, V. S., Veerakul, G., Chinchang, W., Petrarat, S., Pung-Amritt, P., & Higgs, D. R. (2004). Co-inheritance of Hb Pak Num Po, a novel alpha1 gene mutation, and alpha0 thalassemia associated with transfusion-dependent Hb H disease. *Am J Hematol*, 75(3), 157-163. doi:10.1002/ajh.10479
- Wee, Y. C., Tan, K. L., Chua, K. H., George, E., & Tan, J. A. (2009). Molecular characterisation of Haemoglobin Constant Spring and Haemoglobin Quong Sze with a Combine-Amplification Refractory Mutation System. *Malays J Med Sci*, 16(3), 21-28.
- Willmore, C., Holden, J. A., Zhou, L., Tripp, S., Wittwer, C. T., & Layfield, L. J. (2004). Detection of c-kit-activating mutations in gastrointestinal stromal tumors by high-resolution amplicon melting analysis. *Am J Clin Pathol*, 122(2), 206-216.
doi:10.1309/4e6u-yby6-2n2f-ca6n
- Yang, Y., Lou, J. W., Liu, Y. H., He, Y., & Li, D. Z. (2014). Screening and diagnosis of Hb Quong Sze [HBA2: c.377T > C (or HBA1)] in a prenatal control program for thalassemia. *Hemoglobin*, 38(3), 158-160. doi:10.3109/03630269.2014.910669
- Yimniam, W., & Jindadamrongwech, S. (2016). Scanning for α -Hemoglobin Variants by High-Resolution Melting Analysis. *J Clin Lab Anal*, 30(5), 633-640.
doi:10.1002/jcla.21914
- Zhang, H. B., Liu, D. P., & Liang, C. C. (2002). The control of expression of the alpha-globin gene cluster. *Int J Hematol*, 76(5), 420-426. doi:10.1007/bf02982807





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ข้อมูลตัวอย่างในการทดลอง

ตาราง 11 ตัวอย่างทดลองแสดงชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ และผลDNA Sequencing

ลำดับที่	Lab No.	Mutations	ผล DNA Sequencing
1	T1/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
2	T2/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
3	T3/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
4	T4/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
5	T5/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
6	T6/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
7	T7/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
8	T8/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
9	T9/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
10	T10/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
11	T11/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
12	T12/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
13	T13/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
14	T14/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
15	T15/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
16	T16/63	Hb Q-Thailand	CAC/GAC
17	T17/63	Hb Q-Thailand	CAC/CAC
18	T18/63	Hb Ananthraj	CAG/CAG
19	T19/63	Hb Siam	CGT/GGT
20	T20/63	Hb Hekinan	GAG/GAT
21	T21/63	Hb Hekinan	GAT/GAT
22	T22/63	Hb Hekinan	GAT/GAT
23	T23/63	Hb Queens	CTG/CGG
24	T24/63	Hb Nakhon Ratchasima	GTC/GCC
25	T25/63	Hb Pak Num Po	+T/+T

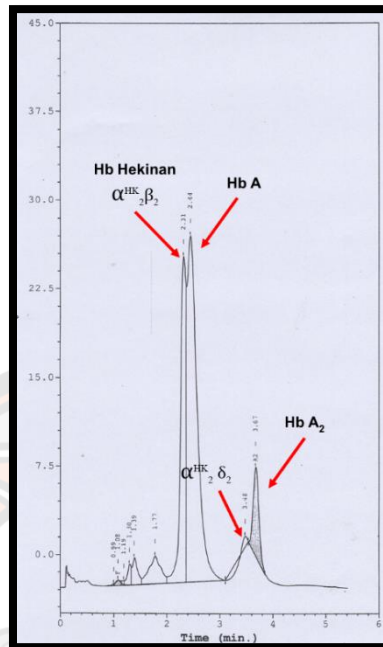
ตาราง 10 (ต่อ)

ลำดับที่	Lab No.	Mutations	ผล DNA Sequences
26	T26/63	Unknow mutation	GAG/AAG
27	T27/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
28	T28/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
29	T29/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
30	T30/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
31	T31/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
32	T32/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
33	T33/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
34	T34/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
35	T35/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
36	T36/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
37	T37/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
38	T38/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
39	T39/63	Hb Constant Spring	CAA/CAA
40	T40/63	Hb Constant Spring	CAA/TAA
41	T41/63	Hb Constant Spring	CAA/TAA
42	T42/63	Hb Constant Spring	CAA/TAA
43	T43/63	Hb Constant Spring	CAA/TAA
44	T44/63	Hb Constant Spring	CAA/TAA
45	T45/63	Hb Constant Spring	CAA/TAA
46	T46/63	Hb Constant Spring	CAA/TAA
47	T47/63	Hb Constant Spring	CAA/TAA
48	T48/63	Hb Pakse'	TAT/TAA
49	T49/63	Hb Pakse'	TAT/TAA
50	T50/63	Hb Pakse'	TAT/TAA

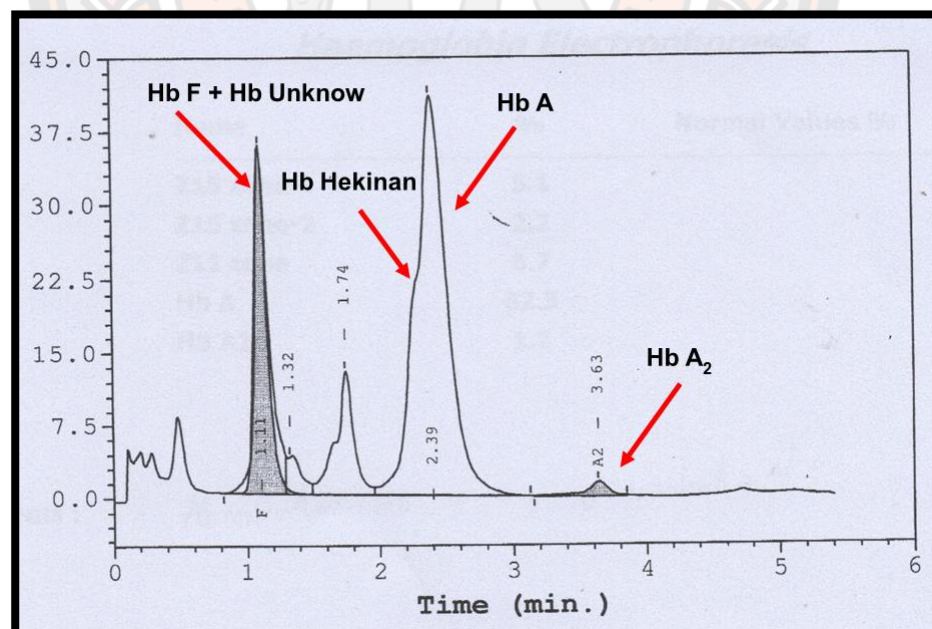
ตาราง 10 (ต่อ)

ลำดับที่	Lab No.	Mutations	ผล DNA Sequences
51	T51/63	Hb Thailand	ACG/AAG
52	T52/63	Hb Quong Sze	CAC/GAC
53	T53/63	Wild-type	-
54	T54/63	Wild-type	-
55	T55/63	Wild-type	-
56	T56/63	Wild-type	-
57	T57/63	Wild-type	-
58	T58/63	Wild-type	-
59	T59/63	Wild-type	-
60	T60/63	Wild-type	-
61	T61/63	Wild-type	-
62	T62/63	Wild-type	-

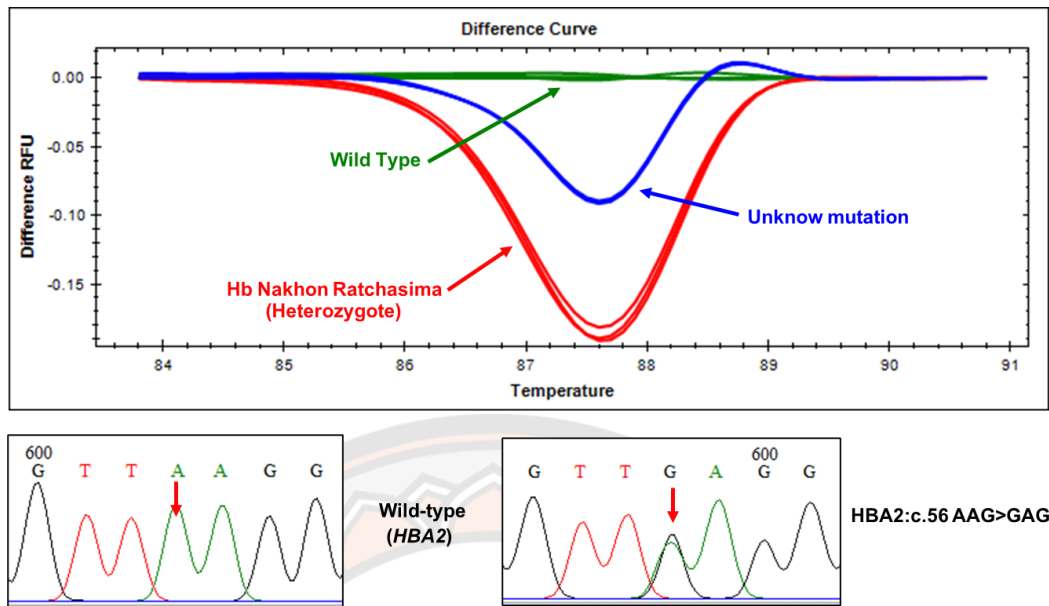
ภาคผนวก ข ผลวิเคราะห์เพิ่มเติม



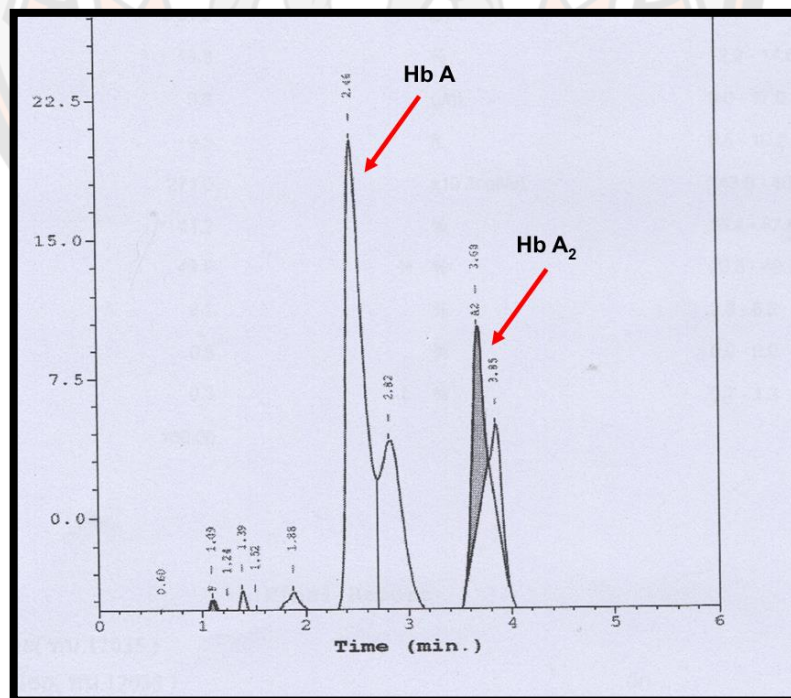
ภาพ 37 Chromatogram ของ Hb Hekinan ร่วมกับแอลฟาซีโรรัลส์ซีเมียชนิด SEA



ภาพ 38 Chromatogram ของ Hb Hekinan เกิดร่วมกับ Unknow mutation

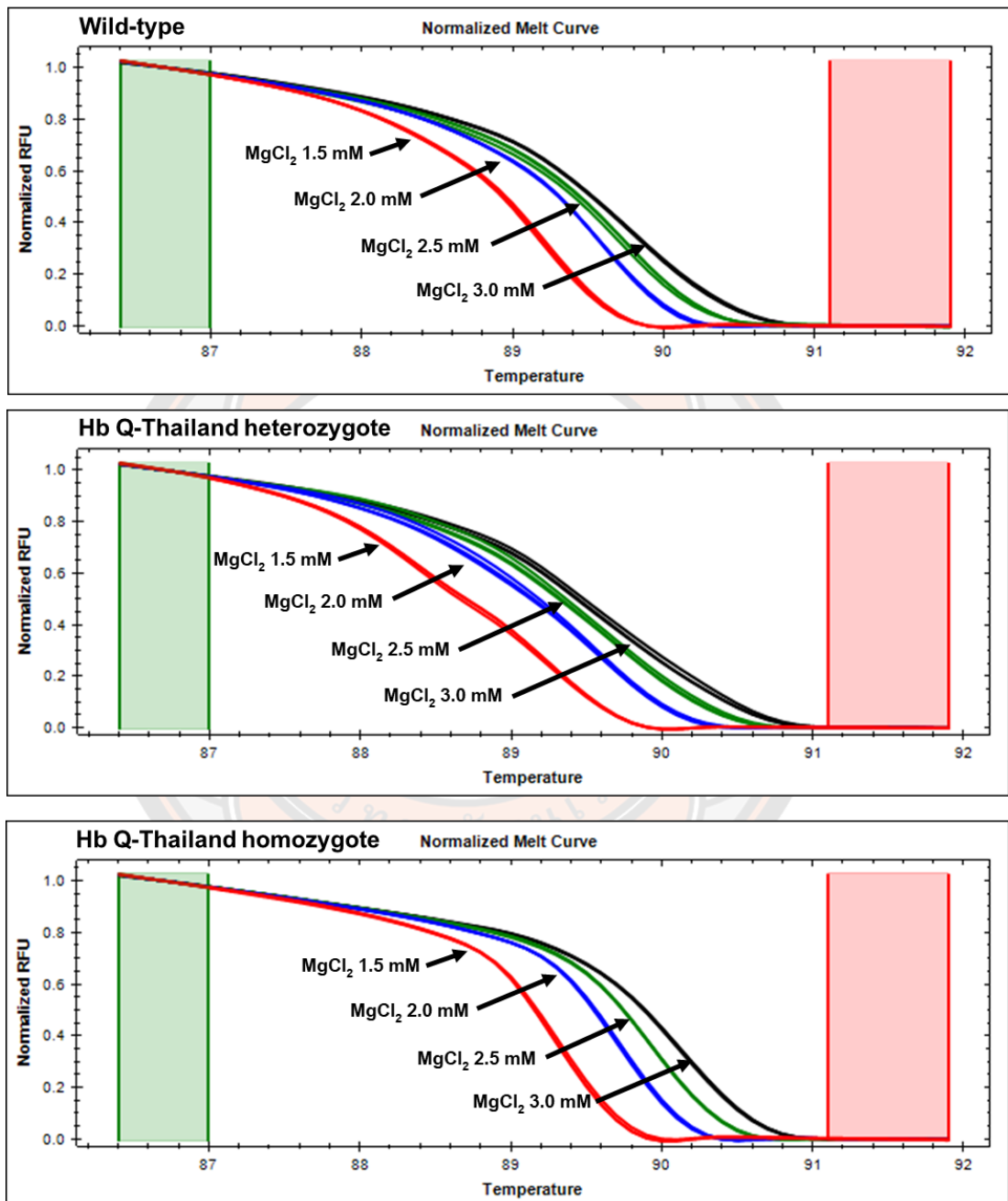


ภาพ 39 การเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่ง codon 56 (HBA2:c.56 AAG>GAG) บริเวณ Exon ที่ 2 ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 เปรียบเทียบกับ Difference curve จากการวิเคราะห์เทคนิค HRM โดยใช้คู่มือ E4TF/E4TR

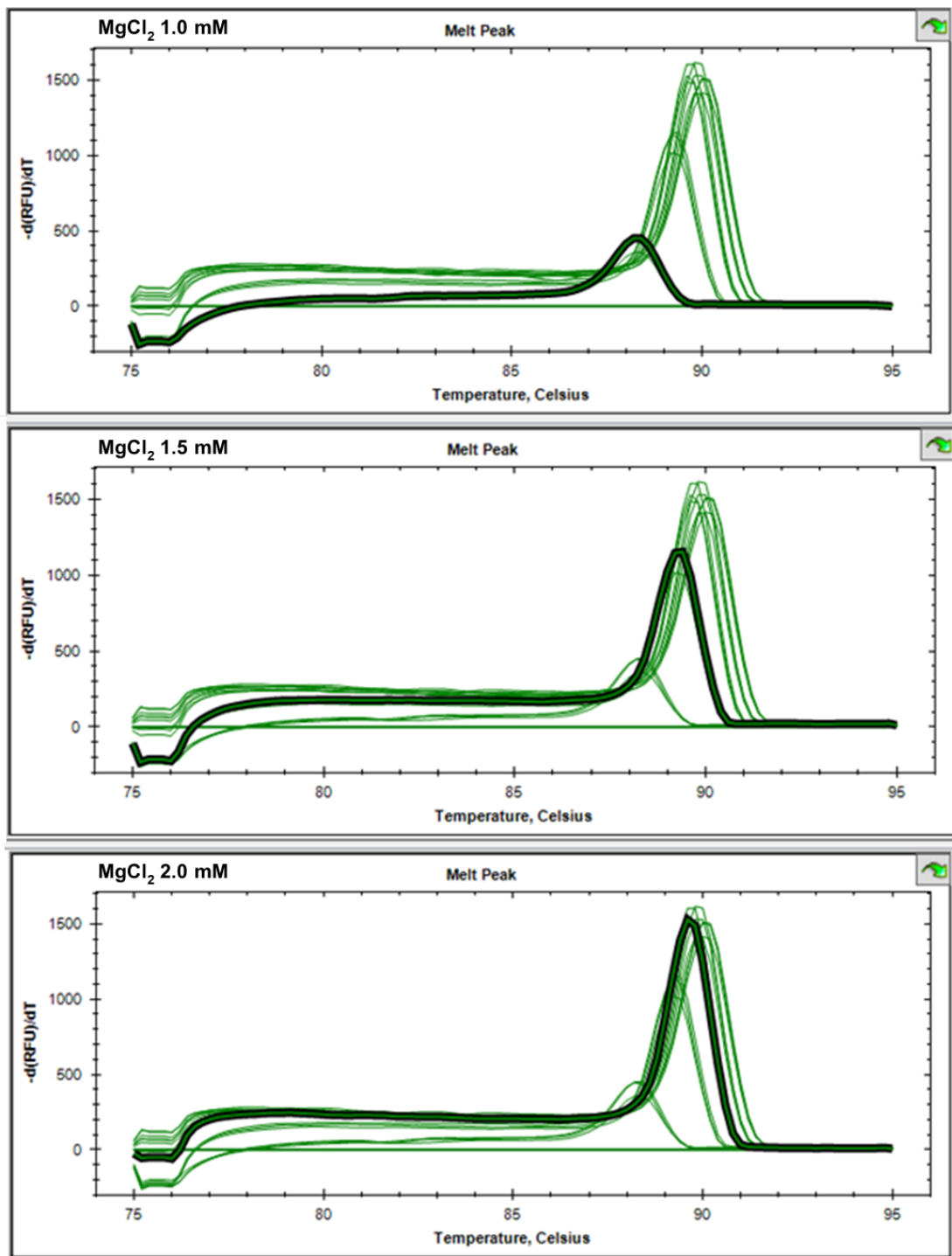


ภาพ 40 Chromatogram ของ Hb Nakhon Ratchasima

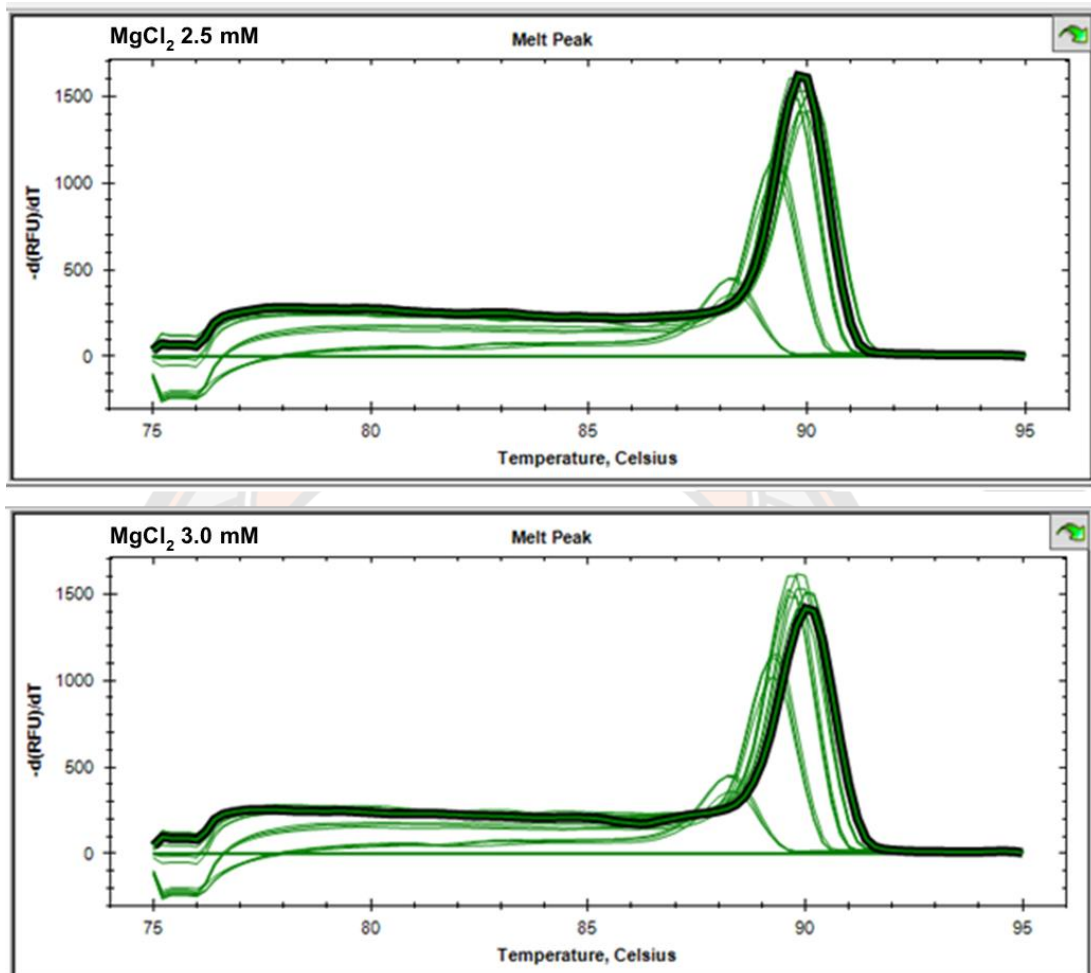
ภาคผนวก ค การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ Real-time PCR ร่วมกับ HRM analysis



ภาพ 41 ความเข้มข้น $MgCl_2$ ส่งผลต่อลักษณะของ Normalized melting curve ด้วยคู่มือเมอร์EQF/EQR ที่มีการเติม Q-Solution ในตัวอย่าง Wild-type, Hb Q-Thailand heterozygote และ Hb Q-Thailand homozygote



ภาพ 42 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ส่งผลต่อลักษณะของ melt peak จากการทดสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM ด้วยคู่มือ EQF/EQR ที่มีการเติม Q-Solution



ภาพ 42 ความเข้มข้นของ MgCl₂ ส่งผลต่อลักษณะของ melt peak จากการทดสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ HRM ด้วยคูเพรเมอร์ EQF/EQR ที่มีการเติม Q-Solution (ต่อ)

ภาคผนวก ง เอกสารเพิ่มเติม

AF 08-09/5.0

COA No. 132/2020

IRB No. P10034/63



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
99 หมู่ 9 ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000 เบอร์โทรศัพท์ 05596

หนังสือรับรองโครงการวิจัยครั้งแรก

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ	: การตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ของยีนไมโทคอนเดรียด้วยเทคนิค High resolution melting (HRM) analysis
ผู้วิจัยหลัก	: ดร.นงลักษณ์ อิ่มตระกูล
สังกัดหน่วยงาน	: คณะวิทยาศาสตร์
ผู้ร่วมวิจัย	: รศ.นพ.พีระพล ว่อง นายศิริพัฒน์ ม่วงป่า
วิธีทบทวน	: แบบเร่งรัด (Expedited Review)
รายงานความก้าวหน้า	: ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินโครงการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี

เอกสารรับรอง

1. AF 01-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 18 มีนาคม 2563
2. AF 02-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 18 มีนาคม 2563
3. AF 03-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 18 มีนาคม 2563
4. สรุปโครงการเพื่อการพิจารณาทางจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 20 มีนาคม 2563
5. โครงการวิจัย เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 05 มีนาคม 2563
6. ประวัติผู้วิจัย เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2563
7. แบบบันทึกข้อมูล เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 05 มีนาคม 2563
8. งบประมาณที่ได้รับโดยย่อ เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 05 มีนาคม 2563

ลงนาม: *ปิลาภ อิ่มตระกูล*

(นายแพทย์สมบูรณ์ ดันสุภสวัสดิกุล)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

วันที่รับรอง : 21 พฤษภาคม 2563

วันหมดอายุ : 21 พฤษภาคม 2564

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขตั้งที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

ภาพ 43 เอกสารรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์