อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

สัญญาเลขที่....รด.50/02.....

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## ความคงตัวของเลือดแห้งสำหรับตรวจ alpha-thalassemia (SEA type)

## Stability of dried blood spot for alpha-thalassemia (SEA type) detection

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 5 JUL 2011
เลขทะเบียน 15662126
เลขเรียกหนังสือ 2 QP
QZ
.5
Q324S
2550

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

จิรภาส จงจิตวิมล

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความร่วมมือของนางสาวปิยะพัชร ยามา นางสาวพรรณธร ปุณโกฑก นางสาวสมจิตร รัตนคร นิสิตชั้นปีที่ 4 สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และคุณปริศนา เจริญพร นักวิทยาศาสตร์ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร

ขอขอบคุณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในโครงการนี้ และบุคคลอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

จิรภาส จงจิตวิมล

**ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย**

ชื่อโครงการ: ความคงตัวของเลือดแห้งสำหรับตรวจ alpha-thalassemia (SEA type)

Stability of dried blood spot for alpha-thalassemia (SEA type) detection

ชื่อผู้วิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

อาจารย์จิรภาส จงจิตวิมล

หน่วยงานที่สังกัด: ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

หมายเลขโทรศัพท์: 0-5526-1000 ต่อ 6345

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสาขา: เทคนิคการแพทย์

แหล่งทุนที่ได้รับและปีงบประมาณ: ทุนสนับสนุนงานวิจัยของคณะสหเวชศาสตร์

งบประมาณรายได้ ปี พ.ศ. 2550

จำนวนเงิน: 46,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย ตั้งแต่ 1 พฤศจิกายน 2549- 30 กันยายน 2550

---

**ส่วนที่ 2 บทคัดย่อภาษาไทย**

**ที่มาและความสำคัญ** α-Thalassemia 1 (SEA type) เป็นกลุ่มโรคที่พบได้บ่อยในประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันการเก็บตัวอย่างเลือดที่นิยมใช้ในการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) คือการเก็บในลักษณะเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ทำให้เกิดปัญหาในการขนส่งสิ่งส่งตรวจ เนื่องจากเป็นหลอดทดลอง ซึ่งใช้พื้นที่ในการเก็บมากและเกิดการแตกของหลอดทดลอง จึงทำให้เกิดความเสียหายในการขนส่งไปยังห้อง ปฏิบัติการต่างๆ มากกว่าการเก็บตัวอย่างเลือดแห้ง คณะผู้วิจัยจึงได้ใช้กระดาษ Whatman 3MM มาใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งเพื่อตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type)

**วิธีการ** ผู้วิจัยใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ซึ่งผ่านการตรวจคัดกรองแล้วว่าให้ผลบวกกับวิธี cellulose acetate electrophoresis สำหรับผู้ที่เป็น Hb E และคนปกติ และสำหรับ α-thalassemia 1 (SEA type) ผ่านการตรวจยืนยันโดยเทคนิค PCR และเทคนิค HPLC สำหรับ β-thalassemia แล้วจำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง นำมาศึกษาความคงตัวในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษ Whatman 3MM และ สำหรับตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) โดยเปรียบเทียบผลการตรวจที่ให้ผลถูกต้องตรงกับตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ด้วยเทคนิค PCRเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือนโดยทำการตรวจซ้ำทุกเดือน สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Chi-square test

**ผลการทดลอง** จากผลการทดลองพบว่าการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษ Whatman 3MM มีความคงตัวสำหรับตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) โดยให้ผลการตรวจที่ตรงกับผลการตรวจจากการใช้เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value = 0.160)

สรุป พบว่าการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษ Whatman 3MM มีความคงตัวสำหรับตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR เป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 6 เดือน

## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

**Background:** α-thalassemia 1 (SEA type) is the common disease in South East Asia such as Thailand. Currently, the specimen collection is EDTA whole blood that is commonly used for detecting α-thalassemia 1 (SEA type) that is unconvenient for specimen transportation. Because the collecting tubes may be broken during transportation process and required the retaining space to the laboratory for analysis more than the specimen collection on dried blood spots. The aim was to detect stability of dried blood spots on Whatman 3MM for α-thalassemia 1 (SEA type).

**Methods:** Samples of EDTA-anticoagulant venous blood were collected from 20 subjects, 5 subjects of α-thalassemia-1 trait, 5 subjects of β-thalassemia trait, 5 subjects of Hemoglobin E (HbE) and 5 subjects of normal. This proposal was approved by the Human Ethical Committee, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand. We studied stability of dried blood spots on Whatman 3MM for detection of α-thalassemia 1(SEA type) and compared result of accuracy and consistency with EDTA whole blood by PCR technique for least 6 months and repeat every month.

**Results:** There was no statistical significant difference between accuracy and consistency of dried blood spots on Whatman 3MM compared with EDTA whole blood (*P*-value = 0.160).

**Conclusion:** The stability of dried blood spots on Whatman 3MM for detection of α-thalassemia 1 (SEA type) had found by using PCR technique for 6 months.

# สารบัญ


| บทที่ | หน้า |
|---|---|
| 1 บทนำ | 1 |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย | 2 |
| ขอบเขตของการศึกษาวิจัย | 2 |
| 2 เนื้อเรื่อง | 3 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 15 |
| ผลการวิจัย | 19 |
| 3 ข้อวิจารณ์ | 23 |
| 4 สรุปและข้อเสนอแนะ | 25 |
| บรรณานุกรม | 26 |
| ภาคผนวก | 27 |

# สารบัญตาราง


หน้า

ตาราง 1 แสดงความคงตัวของเลือดในการเก็บตัวอย่างเลือดด้วยกระดาษ 20
Whatman 3MM โดยทำการตรวจตั้งแต่เดือนมีนาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2550

# สารบัญรูป


| | | หน้า |
|---|---|---|
| รูป 1 | แสดงผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA | 21 |
| รูป 2 | แสดงผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR ของกระดาษ Whatman 3 MM | 22 |

# บทที่ 1
# บทนำ

## ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การตรวจ alpha thalassemia-1 เป็นการตรวจที่พาหะของธาลัสซีเมียชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียรายใหม่ เมื่อพ่อและแม่เป็นพาหะชนิด alpha thalassemia-1 ทั้งคู่ จะมีโอกาสเกิดผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียชนิดที่ร้ายแรงที่สุดของ คือ Hb Bart's hydrops fetalis ผู้ป่วยส่วนใหญ่เสียชีวิตภายหลังคลอด อีกทั้งการตั้งครรภ์ยังพบภาวะตั้งครรภ์มีพิษ เสียเลือดมากขณะคลอด มีความดันโลหิตสูง ดังนั้นการตรวจ alpha thalassemia-1 ในหญิงตั้งครรภ์จึงมีความสำคัญต่อสาธารณสุขของประเทศ จึงมีการกำหนดการตรวจ alpha thalassemia-1 ในคู่สามีและภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตรโรคนี้

α-thalassemia 1 (SEA type) เป็นกลุ่มโรคที่พบได้บ่อยในประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เช่น ประเทศไทย ซึ่งการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) สามารถตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการได้โดยวิธีการตรวจ DNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มจำนวน DNA ได้เป็นล้านเท่าภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจเมื่อมี DNA จากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาจำนวนน้อย ปัจจุบันการเก็บตัวอย่างเลือดที่นิยมคือ การเก็บในลักษณะเลือดครบส่วน (Whole blood) ที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ทำให้เกิดปัญหาในการขนส่งสิ่งส่งตรวจได้บ่อยๆ เช่น เกิดการแตกของหลอดทดลองก่อให้เกิดความเสียหายในระหว่างการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆ และใช้พื้นที่ในการเก็บมากทำให้เกิดความไม่สะดวกในการขนส่ง

หากการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งโดยใช้กระดาษสามารถรักษาสภาพ และคงตัวของตัวอย่างเลือดเท่ากับหรือใกล้เคียงกับการเก็บตัวอย่างเลือดครบส่วน (Whole blood) ที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA จะทำให้ลดปัญหาที่เกิดขึ้นในการขนส่งลงหรือหมดไปได้และสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานกว่าอีกด้วย การเก็บตัวอย่างเลือดแห้งโดยใช้กระดาษนั้นปัจจุบันได้มีผู้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจหาการติดเชื้อต่างๆเช่น การตรวจเชื้อ HIV, HBV (hepatitis B virus) และการตรวจคัดกรองเด็กแรกเกิดเพื่อหาความผิดปกติ เป็นต้น ส่วนใหญ่จะใช้กระดาษกรองในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งซึ่งมีจำหน่ายอยู่แล้ว แต่เนื่องจากยังไม่เคยมีผู้นำกระดาษโครมาโตกราฟีมาใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้ง และนำการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งมาใช้ในการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำกระดาษโครมาโตกราฟีมาใช้เก็บตัวอย่างเลือดแห้งเพื่อใช้ในการตรวจหาα-thalassemia 1 (SEA type) เนื่องจากมีราคาถูกสามารถหาซื้อได้ง่ายทั้งยังมีคุณสมบัติ

ในการดูดซับสารได้ดี นอกจากนี้แล้ว ยังเป็นการลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วยโดยงานวิจัยนี้เลือกการเก็บตัวอย่างเลือด 2 แบบคือ

**1. Chromatography paper** กระดาษ Whatman 3MM คือกระดาษโครมาโตกราฟีที่ผลิตจากบริษัท Whatman 3MM ซึ่งทำจากเส้นใยเซลลูโลส (cellulose) ชนิดพิเศษที่มีความบริสุทธิ์สูง นอกจากนี้ยังมีการควบคุมคุณภาพในการผลิตอย่างดีเป็นกระดาษที่มีความหนาปานกลางประมาณ 0.34 mm โดยอัตราการไหลผ่าน (flow rate) คือ 130 mm/30 min นำมาใช้ในงานทางห้องปฏิบัติการทางเคมีทั่วไปเช่น โครมาโตกราฟี (chromatography) และการทำ electrophoresis

**2. Whole blood with EDTA** เพื่อนำมาตรวจโดยใช้เทคนิค PCR

## วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย

เพื่อศึกษาความคงตัวของการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษ Whatman 3MM เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน

## ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

เป็นการศึกษาความคงตัวในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษ Whatman 3MM จากผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type) จำนวน 5 ราย และ β-thalassemia จำนวน 5 ราย ที่เหลือจากการตรวจที่หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างวันที่ 23 - 26 มีนาคม พ.ศ. 2550 ซึ่งผ่านการตรวจโดยเทคนิค PCR และ HPLC นอกจากนั้นยังมีผู้ที่เป็น Hb E จำนวน 5 ราย คนปกติจำนวน 5 ราย ซึ่งมาจากการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการโดยการตรวจโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis รวมทั้งสิ้นจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR ให้มีความถูกต้องในการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) จากการใช้เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA นอกจากนี้ยังศึกษาระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งในช่วงเวลาอย่างน้อย 6 เดือน โดยทำการตรวจซ้ำทุกเดือน

# บทที่ 2
# เนื้อเรื่อง

## ธาลัสซีเมีย (Thalassemia)

ธาลัสซีเมีย เป็นโรคที่เกิดจากการที่เม็ดเลือดแดงสังเคราะห์ฮีโมลโกลบินน้อยลงเนื่องจากยีนผิดปกติทำให้สร้าง globin chain ไม่ได้ หรือมีการสร้าง globin chain ในปริมาณที่ลดลงโดยที่โครงสร้างของ globin chain ยังคงปกติ [2] ซึ่งความผิดปกตินี้มี 2 ลักษณะคือ

1. มีการกลาย (mutation) ของ gene ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนสายโกลบิน เช่น ทำให้เกิดมีการหลุดหายไปของกรดอะมิโนหรือมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง

2. Gene ที่สร้างหรือ gene ที่เกี่ยวกับการสร้างสายโกลบินมีความผิดปกติทำให้การสร้างสายโกลบินลดลงหรือไม่สร้างเลย ทำให้มีสัดส่วนปริมาณสายโกลบินต่างชนิดกันในโมเลกุลของฮีโมโกลบินไม่สมดุล เรียกความผิดปกตินี้ว่า ธาลัสซีเมีย [1]

**ธาลัสซีเมียที่สำคัญมี 2 ชนิด คือ**

### 1. α-thalassemia

เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้าง α globin chain มี 2 ตำแหน่ง (loci) บนแขนข้างสั้นของ chromosome คู่ที่ 16 คือ α1 และ α2–globin gene คนปกติจึงมียีน α อยู่ 2 คู่ หรือ 4 อัน (genotype เป็น αα/αα) ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุทำให้เกิด α-thalassemia ซึ่งมีการสร้าง α globin chain น้อยลงหรือไม่มีการสร้างเลยนั้น ส่วนใหญ่เกิดจากการที่ α globin gene ขาดหายไป (gene deletion) มีเพียงส่วนน้อยที่เกิดจากการโครงสร้างของยีนผิดปกติ โดยเนื้อยีนยังคงอยู่ ซึ่งเรียกว่า nondeletion α-thalassemia

Gene deletion ขนาดของ DNA และจำนวนของยีนที่ขาดหายไปจาก chromosome ทำให้เกิด α-thalassemia ที่มีความรุนแรงต่าง ๆ กัน

#### 1.1 α-thalassemia 1

α globin gene ทั้งสองตำแหน่งที่อยู่บน chromosome ข้างเดียวกัน (α1, α2) ขาดหายไป (--) จะเกิดเป็น α–thalassemia 1 หรือ $\alpha^0$-thalassemia ซึ่งจะไม่มีการสร้าง α globin chain จาก chromosome ข้างนี้เลย ขนาดของ DNA ที่ขาดหายไปนี้อาจจะครอบคลุมเฉพาะบริเวณของ α gene หรืออาจจะเลยไปจนถึง ζ-globin gene ด้วย α–thalassemia 1 ในประเทศไทยและประเทศใน

แถบ Southeast Asia เกิดจากการที่ DNA ตั้งแต่บริเวณที่เป็น ψζ - gene จนถึง α globin gene ทั้งสองอัน ขาดหายไปประมาณ 20 kb (Southeast Asian type, SEA type)

**1.2 α-thalassemia 2**

เกิดจากการขาดหายไปของ α globin gene บน chromosome ข้างหนึ่งเพียงยีนเดียว (-α) จึงมีการสร้าง α globin chain ได้บ้าง แต่จะมีปริมาณลดน้อยกว่าปกติ α-thalassemia 2 จึงรุนแรงน้อยกว่า α–thalassemia 1 ซึ่งยังแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดตามตำแหน่งและขนาดของ DNA ที่ขาดหายไปคือ

1.2.1 Leftward deletion type เกิดจากเนื้อ DNA บริเวณ α 2 globin gene ขาดหายไป 4.2 kb จึงเหลือเพียง α1 globin gene เท่านั้นที่สร้าง α globin chain ได้

1.2.2 Rightward deletion type เกิดจากเนื้อ DNA ที่อยู่ระหว่าง α1 α 2 – globin gene ขาดหายไป 3.7 kb และ DNA ส่วนที่เหลือของ α1 และα 2 gene กลายเป็น hybrid gene ที่มี nucleotide sequence เช่นเดียวกับ α– globin gene chromosome นั้นจึงยังคงมี α–globin gene เหลืออยู่ 1 อัน ซึ่งควบคุมการสร้าง α globin chain ได้เช่นเดียวกัน

1.2.3 Nondeletion α-thalassemia ตรวจไม่พบว่ามีการแหว่งหายไปของเนื้อยีนแบบ α–thalassemia 1 และ α–thalassemia 2 แต่มี base เปลี่ยนไปหรือมี base จำนวนน้อยๆ หายไปหรือเกินมา [2]

**2 β-thalassemia**

ชนิดที่มีการสร้าง β globin chain ลดน้อยลงหรือสร้างไม่ได้เลย ในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด β-thalassemia 1 ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

**2.1 β°-thalassemia** เกิดจากความผิดปกติของยีน แต่ยังไม่สามารถสร้าง β globin chain ในผู้ป่วยที่เป็น Homozygote มักจะมีความรุนแรงคือ ซีดมาก ต้องได้รับการให้เลือดอยู่เสมอ ผู้ป่วยไม่มีฮีโมโกลบินเอ เนื่องจากไม่มีการสร้าง β globin chain ในเม็ดเลือดแดง β°-thalassemia เกิดได้ 2 สาเหตุหลักคือ

1. Gene deletion ของ β globin gene ซึ่งอาจขาดหายไปหมดหรือบางส่วนทำให้ไม่สามารถสร้าง mRNA ที่จะใช้สร้าง β globin chain ได้

2. Point mutation ของ base ที่ β globin gene ในลักษณะต่าง ๆ ทำให้ไม่สามารถสร้าง mRNA หรือ β globin chain เช่น มีการเปลี่ยนแปลง base ทำให้ กรอบ codon เกิดการเหลื่อม จนเกิดมี terminator codon แห่งใหม่ขึ้นก่อนที่ควรเป็น ทำให้หยุดสร้าง β globin chain ขณะ translation จึงได้สาย β globin chain ที่ใช้การไม่ได้ หรืออาจเกิด

point mutation ตรงบริเวณ splice junction ของ gene ทำให้การตัดเชื่อม RNA precursor (splicing) เพื่อให้เป็น mRNA ที่สมบูรณ์แบบนั้นทำไม่ได้จึงไม่เกิด mRNA สำหรับการสร้าง β globin chain

**2.2 $\beta^+$-thalassemia** เกิดจากความผิดปกติของยีนแต่ยังสามารถสร้าง β globin chain แต่สร้างในปริมาณน้อย โดยลดลงเหลือประมาณร้อยละ 5 – 30 ของการสร้างปกติ ผู้ป่วย homozygote จึงมี Hb A ได้ สาเหตุความผิดปกติเกิดจากมี mutation ที่ nucleic acid เข้าใจว่าเป็นบริเวณ promoter region ซึ่งควบคุมกระบวนการ transcription ของ gene ทำให้มีการสร้าง RNA น้อยลงหรือเกิด point mutation ใน intron หรือ exon แล้วทำให้เกิดมีจุดตัดแห่งใหม่ ซึ่งจุดตัดสองแห่งคือ ของเดิมกับของใหม่ที่ผิดปกติ กระบวนการตัดเชื่อม RNA จึงเกิดได้ทั้งสองแห่งนี้ ถ้าตัดที่เดิมก็จะได้ mRNA ที่ปกติ ถ้าตัดที่ใหม่จะได้ mRNA ที่ผิดปกติที่ไม่สามารถเป็นแม่แบบสร้าง β globin chain ได้ ด้วยกลไกนี้เองทำให้ mRNA จำนวนหนึ่งต้องสูญเสียไป แต่ก็ยังมี mRNA ปกติจำนวนหนึ่งที่นำมาสร้าง β globin chain ได้ ทำให้มีการสร้าง β globin chain บ้าง ปัจจุบันทราบแล้วว่า Hb E ไม่เพียงแต่เป็น Hb ที่ผิดปกติเท่านั้น แต่ยังมีลักษณะแบบ
ธาลัสซีเมียด้วยคือ มีการสร้าง β globin chain น้อยลงกว่าปกติ ทั้งนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลง codon ตำแหน่งที่ 26 มีผลทำให้ codon ที่ 25 กลายเป็นจุดตัดใหม่อีกแห่ง โดยที่จุดตัดเดิมก็ยังคงอยู่ไม่เปลี่ยนแปลงจึงเกิดผลแย่งกันตัดที่สองจุดดังกล่าว ทำให้สร้าง β globin chain น้อยลง [1]

เนื่องจากการถ่ายทอดของยีนธาลัสซีเมียเป็นแบบลักษณะด้อย (autosomal recessive) ผู้ที่มียีนธาลัสซีเมียเพียงยีนเดียวจะเป็นเพียงพาหะ (trait หรือ heterozygote) ซึ่งไม่เป็นโรค ผู้ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียต้องได้รับยีนธาลัสซีเมียที่อยู่บนตำแหน่ง (locus) เดียวกัน บนโครโมโซมที่คู่กันอย่างน้อย 2 ยีน หรือได้รับยีนธาลัสซีเมียร่วมกับยีนของฮีโมโกลบินผิดปกติบางชนิดที่มีลักษณะเหมือนยีนธาลัสซีเมีย เช่น Hb constant spring , Hb E เป็นต้น ผู้ที่มียีนผิดปกติเหมือนกันทั้งสองอันเรียกว่า homozygote ผู้ที่มียีนผิดปกติต่างชนิดกัน แต่ยีนนั้นอยู่บนตำแหน่งเดียวกันบนโครโมโซมที่คู่กันเรียกว่า compound heterozygote เช่น β-thalassemia/ Hb E หรือ α-thalassemia/ Hb CS ส่วนผู้ที่มียีนผิดปกติต่างชนิดกันและแต่ละยีนอยู่บนตำแหน่งที่ต่างกันเรียกว่า double heterozygote เช่น α-thalassemia / β-thalassemia ซึ่งจะไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย

การที่สังคมใดสังคมหนึ่ง เช่น ในประเทศไทยมีผู้ที่มียีนผิดปกติดังกล่าวเป็นจำนวนมาก ผู้ที่เป็นพาหะเหล่านี้อาจจะแต่งงานกัน ทำให้มีโอกาสที่จะมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ของยีนที่ผิดปกติชนิดใดชนิดหนึ่งได้ [2]

## Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเออย่างจำเพาะในหลอดทดลองโดยไม่ต้องอาศัยเซลล์ เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) เทคนิคนี้คิดค้นโดย Kary Mullis สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอ จากหนึ่งชิ้นเป็นหลายล้านชิ้นในเวลาไม่นาน สามารถเลือกเพิ่มจำนวนเฉพาะส่วนของดีเอนเอที่ต้องการจากทั้งจีโนมหรือ mRNA ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอ โดยเทคนิค PCR นี้ต้องอาศัย DNA primer ซึ่งเป็นดีเอนเอสายสั้นๆ ขนาดประมาณ 20 -30 เบส จำนวน 2 เส้นซึ่งเป็นดีเอนเอสายเดี่ยวที่สามารถจับคู่กับดีเอนเอสายตรงข้าม (complememtary) ที่บริเวณปลายทั้งสองของดีเอนเอต้นแบบ (DNA template) นอกจากนี้ในปฏิกิริยายังจำเป็นต้องใช้นิวคลีโอไทด์ที่จำเป็นทั้งสี่ชนิด ได้แก่ dATP, dGTP, dCTP, dTTP และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และสารที่จำเป็นต่างๆ ในการสังเคราะห์ดีเอนเอ [3]

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA โดยเทคนิค PCR เป็นปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของ DNA แม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C

2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-58 °C เพื่อให้ primer สามารถเกาะกับ DNA แม่พิมพ์สายเดียวตรงบริเวณเบสคู่สม

3. ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่ต่อออกจาก primer ในทิศทางจาก 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* DNA polymerase อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 °C [4]

เมื่อปฏิกิริยาดำเนินมาถึงขั้นตอน Primer extension ถือเป็น 1 รอบของปฏิกิริยา PCR รอบต่อๆ ไป จะเป็นการเริ่มต้นในขั้นตอน denaturation ใหม่วนเวียนเช่นนี้ประมาณ 20-40 รอบ ทำให้ได้ปริมาณดีเอนเอผลผลิต (PCR product) จำนวนหลายล้านชิ้นได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจาก PCR product ที่ได้ในแต่ละรอบจะถูกนำมาใช้เป็น DNA template ในรอบต่อๆไป ทำให้จำนวนชิ้นดีเอนเอมีการเพิ่มปริมาณแบบ expotential ($2^n$ , n = จำนวนรอบของการทำ PCR) [3]

## Optimization of PCR

ผลสมประสงค์ (efficiency) ของปฏิกิริยา PCR product ประเมินได้จากปัจจัย 3 อย่าง คือ

1. Specificity คือ การที่ได้ PCR product เพียงชนิดเดียวจาก target sequence ที่ต้องการใน DNA template

2. Efficiency คือ การที่ได้ PCR product จำนวนมาก (yield) โดยใช้จำนวนรอบสำหรับ amplification น้อย

3. Fidelity คือ การที่ลำดับเบสใน PCR product ที่ได้จาก amplification มีความถูกต้อง (accuracy) ตรงตามลำดับเบสใน DNA template ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นมักเกิดจากเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

PCR ที่จะให้ผลดีจะต้องได้ amplified DNA product ที่มี high specificity, high efficiency และ high fidelity ที่ต้องอาศัยส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาที่พอเหมาะ ได้แก่ ส่วนผสมของ buffer อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบ และคุณสมบัติของ *Taq* DNA polymerase เป็นต้น [5]

มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการทำ PCR ที่ต้องปรับให้มีความเหมาะสมปัจจัยที่สำคัญได้แก่

**1. Primers**

สิ่งสำคัญที่สุดเกี่ยวกับตัว primers ก็คือ การคัดเลือก หรือการออกแบบ primers ให้เหมาะสมกับงาน PCR แต่ละงาน ซึ่งการออกแบบ primers มีหลักเกณฑ์คร่าวๆ ดังนี้คือ

1. Primer ควรมีขนาดความยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์และประกอบด้วย G+C ประมาณ 50-60% พยายามหลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่มี polypyrimidine หรือ polypurines

2. Primer ควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมทางปลาย 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของ DNA แม่พิมพ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังกล่าวควรมีความจำเพาะซึ่งไม่พบในบริเวณอื่นๆ ของสายแม่พิมพ์

3. การเรียบเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของ primers ทั้งคู่ไม่ควรจะเป็นคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด primer- dimer

4. การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer แต่ละส่วนไม่ควรจะมี palindromic sequence เพื่อป้องกันการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ primer โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3' ของ primer

5. ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกัน และอยู่ในช่วง 55-70°C ค่า Tm สามารถคำนวณโดยใช้สูตรง่ายๆ คือ คิด 2°C สำหรับ A หรือ T และ 4°C สำหรับ G หรือ C

ในปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปมากมายสำหรับใช้ในการคัดเลือก primer ที่เหมาะสมในการทำ PCR ในการทำ PCR นอกจากการคัดเลือก primer ที่เหมาะสมแล้ว ความเข้มข้นของ primer ก็เป็นสิ่งสำคัญเช่นกัน ความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง

0.1-0.5 µM ถ้าปริมาณ primer มากเกินไปจะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) เพิ่มขึ้น เป็นผลให้ PCR product ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นมากมาย และยังเพิ่มโอกาสการเกิด primer-dimer ให้สูงขึ้น เป็นผลให้ได้ PCR product ที่ต้องการลดลง

**2. ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase**

ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase จะอยู่ในช่วง 1.0-2.5 ยูนิต ต่อ 100 µl การใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงเกินไปจะก่อให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น

**3. ความเข้มข้นของ magnesium ion ($Mg^{2+}$)**

$Mg^{2+}$ จัดเป็นอิออนที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในปฏิกิริยา PCR เนื่องจากมีผลต่อ primer annealing และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) ถ้าความเข้มข้นของ $Mg^{2+}$ มากเกินไป จะก่อให้เกิด PCR product แบบไม่จำเพาะเกิดขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นของ $Mg^{2+}$ น้อยเกินไปจะทำให้ได้ PCR product ลดลง โดยทั่วไปในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ dNTPs แต่ละชนิดในความเข้มข้น 200 µM จะอยู่ในช่วง 0.5-2.5 mM แต่ถ้ามีการใช้ dNTPs ในปริมาณที่สูงกว่านี้ ต้องปรับความเข้มข้นของ $Mg^{2+}$ ให้สูงขึ้น เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับ $Mg^{2+}$ ดังนั้นถ้ามีปริมาณ dNTPs มากไป มันจะไปจับกับ $Mg^{2+}$ ในปริมาณที่มากจนทำให้เหลือ $Mg^{2+}$ ในรูปอิสระมีไม่เพียงพอสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR

**4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)**

dNTPs ที่ใช้ในงาน PCR จะต้องมี pH เท่ากับ 7.0 ส่วนความเข้มข้นของdNTPs แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200 µM ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา PCR อย่างจำเพาะถูกต้องตลอดจนได้ PCR product ในปริมาณที่สูง การใช้ปริมาณ dNTPs ที่มีความเข้มข้นมากเกินไป จะก่อให้เกิด mispriming ของ primer และ misincorporation ของ dNTPs

**5. บัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR**

บัฟเฟอร์มาตรฐานที่นิยมใช้ในงาน PCR คือ 10 - 50 mM Tris-HCl pH 8.3 - 8.8 และ มี KCl ที่มีความเข้มข้นประมาณ 50 mM ร่วมอยู่ด้วย KCl ทำหน้าที่ในการเร่งการเกิด primer annaeling แต่ถ้าความเข้มข้นของ KCl มากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของ *Taq* DNA polymerase [4]

**6. Cycling parameters**

6.1. Denaturation temperature โดยปกติมักจะคลายเกลียวของ DNA เส้นคู่ให้ออกจากกันที่ 95 °C นาน 30-60 วินาที แต่ DNA template ที่ประกอบด้วยเบส G และ C เป็นจำนวนมาก อาจจะต้องการ denaturation temperature สูงขึ้น ทั้งนี้เพราะ G และ C จับกัน ด้วย 3 H-bond ถ้า DNA แยกกันได้น้อย จะทำให้ primer เข้าไปจับกับ DNA template น้อย จะเกิด PCR

product น้อย แต่ denaturation temperature ที่สูงเกินไปหรือระยะเวลา denature นานเกินไป อาจทำให้ activity ของเอนไซม์เสียไป จะเกิด PCR product น้อยเช่นกัน อาจดัดแปลงวิธีการ โดยการ denature DNA ที่ 95 °C ประมาณ 5-10 นาที แล้วเติม *Taq* DNA polymerase ลงในส่วนผสมและเริ่มปฏิกิริยา PCR

6.2. Annealing temperature คือ อุณหภูมิที่ primer เข้าไปจับกับ DNA บริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (complementary) primers ทั้งสองควรจะมี Tm ใกล้เคียงกันหรือเท่ากัน เพราะการเพิ่มจำนวน DNA แบบทวีคูณ (exponential amplification) จะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ถ้า primer ข้างหนึ่งจับกับ DNA template ที่ annealing temperature ที่ต่ำจะทำให้ primer เข้าไปจับ DNA ผิดตำแหน่ง (mispriming) และทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ non-target sequence มากขึ้น annealing temperature ที่สูงจะได้ PCR product ที่มี specificity ดี แต่อาจจะมี yield (efficiency) น้อยลง เพราะ primer อาจจะเข้าไปจับกับ target DNA น้อย

6.3. Extension temperature โดยปกติ *Taq* DNA polymerase จะสร้าง DNA ให้เป็นสายยาวออกไปที่อุณหภูมิ 72 °C โดยการเติม dNTPs เข้าไปที่ปลายด้าย 3'-end ตามชนิดของเบสใน DNA template

**7. PCR cycle number**

จำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR ที่จะทำให้มีการเพิ่มจำนวน DNA ได้ดีที่สุด ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆที่อยู่ในปฏิกิริยาได้แก่ DNA template, primers และ cycling parameters โดยทั่วไปจะเพิ่มจำนวน DNA 30 รอบ เมื่อเพิ่มจำนวนรอบจะทำให้efficiency ของ amplification ดีขึ้น แต่ specificity จะลดลง ทั้งนี้เพราะเมื่อ DNA มีจำนวนเพิ่มขึ้นถึง $10^{12}$ โมเลกุล และปฏิกิริยา PCR ดำเนินไปได้ 20-30 รอบ ปริมาณเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะลดลงและเป็นตัวจำกัดการเพิ่มของ DNA นอกจากนั้นอัตราส่วนของ DNA template ต่อ primer ที่สูงขึ้นเรื่อยๆ จนมี template ปริมาณมากจะเกิดการจับคู่กันเอง ทำให้ template จับคู่กับ primer น้อยลง ดังนั้นการเพิ่มจำนวน DNA โดยปฏิกิริยา PCR จะไม่เป็นไปแบบทวีคูณ ($2^n$) แต่จะมีอัตราลดลงเข้าสู่ลักษณะ "plateau" [5]

**8. ปัจจัยอื่นๆ**

มีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่างที่สามารถมีผลกระทบต่อการทดลอง เช่นความสะอาดของเครื่องแก้ว และภาชนะต่างๆ ที่ใช้ในงาน PCR ควรล้างให้สะอาดปราศจากสารซักฟอก (detergent), น้ำที่ใช้ในงานควรมีความบริสุทธิ์สูงและปราศจากเอนไซม์ nucleases ต่างๆ เป็นต้น [4]

## ข้อควรระวังในการทำ PCR

เนื่องจากปฏิกิริยา PCR ทำให้มีการเพิ่มจำนวน DNA แบบทวีคูณ ($2^n$) จึงต้องระมัดระวังมิให้มีการปนเปื้อนของ DNA ที่ไม่ใช่ template สำหรับ PCR ที่เราต้องการ DNA contamination เกิดจาก

- DNA จากตัวอย่าง (specimen) อื่น
- DNA จาก recombinant clone ที่ได้จากการทดลอง
- DNA จาก PCR ครั้งก่อน (carryover contamination)

โดยทั่วไปควรจะแยกบริเวณที่เตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยา PCR (pre-PCR area) ออกจากบริเวณที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ PCR product (post-PCR area)

1. อุปกรณ์สำหรับการเตรียม PCR เช่น ถุงมือ, automatic pipette และ Eppendorf tubes ควรจะแยกออกต่างหาก ไม่ปะปนกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบและเตรียม DNA และอยู่ในบริเวณที่เป็น pre-PCR area เท่านั้น รักษาความสะอาดของอุปกรณ์เหล่านี้อย่าให้ปนเปื้อน ถุงมือที่ใช้แล้วในบริเวณ post-PCR อาจมี PCR product ปนเปื้อนอยู่ ถ้านำมาในบริเวณ post-PCR อาจจะเกิดการปนเปื้อนขึ้นได้

2. น้ำยา เช่น *Taq* DNA polymerase 10X buffer dNTP mix ควรจะแบ่งออกเป็น aliquot เล็กๆ เพื่อลดการปนเปื้อนที่อาจจะเกิดขึ้น ควรจะมี negative control สำหรับปฏิกิริยา PCR คือทำ PCR โดยไม่ใส่ DNA template เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA ในน้ำยาต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

3. สารเคมีและน้ำยาที่ใช้สำหรับปฏิกิริยา PCR จะต้องเลือกชนิดที่มีคุณภาพดีที่สุดไม่มีการปนเปื้อนของ heavy metal ion หรือ nuclease ซึ่งจะขัดขวางปฏิกิริยา PCR ได้ น้ำที่ใช้ควรจะเป็นน้ำกลั่น (distilled water) หรือ deionized water ที่เตรียมใหม่และผ่านการนึ่ง (autoclave) แล้ว แบคทีเรียและเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทำให้เกิดผลผิดพลาดได้

4. อาจจะเติม sodium azide ลงในน้ำยาที่เก็บไว้ที่ 20 - 25°C ได้ 0.025 % sodium azide ในน้ำยาที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ไม่ขัดขวางปฏิกิริยา PCR

5. อาจจะทำความสะอาดบริเวณที่ใช้ทำ PCR ด้วยสารละลาย sodium hypochlorite [5]

## DNA electrophoresis and staining

### 1 Gel electrophoresis

เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการวิเคราะห์ DNA เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำง่าย สะดวก และรวดเร็วโดยใช้ปริมาณ DNA เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2 หลักการของ Gel electrophoresis

เป็นการวิเคราะห์ DNA ภายใต้สนามไฟฟ้า (electrophoresis) โดยผ่านตัวกลางคือวุ้น (gel) gel ที่ใช้กันทั่วไปคือ agarose gel และ polyacrylamide gel [5] โดยที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นต่ำมีความสามารถแยก DNA ที่มีขนาด > 500 – 1,000 base pairs(bp)ในขณะที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงส่วนใหญ่ใช้ในการศึกษา DNA ที่มีขนาดเล็กกว่า 500 base pairs [4] วิธีนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์และทำให้ชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการมีความบริสุทธิ์โดย DNA จากจุดเริ่มต้นจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจาก DNA มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟส ทำให้มีประจุเป็นลบ

3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA ผ่าน gel ใน electrophoresis ขึ้นอยู่กับ

3.1. ขนาดโมเลกุลของ DNA (Molecular size of the DNA) DNA ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าจะสามารถเคลื่อนที่ผ่าน gel ได้ช้ากว่า DNA ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก [5] ดังนั้นในเวลาเท่ากันและสภาวะเดียวกัน DNA ขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่า DNA ขนาดเล็ก [4]

3.2. รูปร่างของ DNA (Conformation of the DNA) DNAที่มีรูปร่างต่างกันแม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ภายใต้สภาวะเดียวกัน จะเคลื่อนที่ผ่าน gel ด้วยความเร็วต่างกัน DNA ที่มีลักษณะเป็นวง (superhelical circular) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่มีลักษณะเป็นเส้น (linear DNA) และ DNA ที่มีลักษณะเป็นเส้นเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่คลายเกลียว (Open circular หรือ Nick circular DNA) [4]

3.3. ความเข้มข้นของ gel (Gel concentration) ขนาด DNA ที่เรานำมาวิเคราะห์เป็นตัวกำหนดชนิดของ gel และความเข้มข้นของ gel ที่ใช้ในการทำ electrophoresis [5] โดย DNA ที่มีขนาดเล็กเหมาะสำหรับใช้ gel ที่มีความเข้มข้นสูงเนื่องจากมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อย จึงทำให้ DNA เคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่า gel ที่มีความเข้มข้นต่ำในขณะที่ gel ที่มีความเข้มข้นต่ำเหมาะที่จะใช้แยก DNA ที่มีขนาดใหญ่ [4]

3.4. ส่วนประกอบของ electrophoresis buffer (Composition of electrophoresis buffer) buffer ที่ใช้ในการกระบวนการ electrophoresis มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA เนื่องจากขึ้นกับประจุหรืออิออน และ ionic strength ในแต่ละ buffer นั้นถ้าไม่มีอิออน (เกิดกรณีใส่ buffer ไม่ท่วมแผ่น gel) การนำไฟฟ้าจะเกิดขึ้นน้อยทำให้ DNA เคลื่อนที่ช้ามากหรือไม่เคลื่อนที่เลย แต่ถ้าใช้ buffer ที่มี ionic strength สูง (กรณีผิดพลาดใช้ 10X buffer แทน) การนำไฟฟ้าจะเกิดขึ้นมาก ทำให้เกิดความร้อนจนกระทั่งละลาย gel และทำลาย DNA ได้

3.5. กระแสไฟฟ้า (Voltage gradient) ถ้าความต่างศักย์สูง DNA จะเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงเกินไปจะมีผลต่อลักษณะแถบ DNA ที่ปรากฏหลังจากการทำ

electrophoresis ที่พบบ่อยที่สุดคือ "smiling effect" ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการที่ gel ที่อยู่ด้านในมีความร้อนสูงกว่า gel ที่อยู่ตรงขอบ ทำให้ DNA ด้านในเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่อยู่ด้านนอก แนวของ DNA ที่เคลื่อนทีจึงมีลักษณะเหมือนอักษร U (U–shaped band) หรือรอยยิ้ม (smiling effect) [5]

**การตรวจดูและการถ่ายภาพ DNA (Visualization and photography of stained DNA)**

ปัจจุบันมีผู้ผลิตเครื่องกำเนิดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 300 และ 366 nm ออกมาจำหน่าย แต่มักใช้เครื่องที่มีความยาวคลื่น 300 nm เนื่องจากความยาวคลื่น 254 nm มีผลทำให้ ethidium bromide หลุดออกจาก DNA ได้ง่ายทำให้เกิด photobleaching คือแสง fluorescent จางลงเร็วและยังสามารถทำลาย DNA ได้เร็วกว่า

เครื่องกำเนิดแสง UV ทำงานเป็น 2 ลักษณะคือ

1. Incident light เป็นเครื่องที่แสงส่องมาจากด้านบน โดยใช้หลอด standard germicidal lamp ขนาด 15 w 2 หลอดส่องลงมายัง gel ที่วางบนแผ่นแก้วสีดำโดยหลอดทั้ง 2 เอียงทำมุมประมาณ 10 – 20 องศา กับแผ่น gel แต่เครื่องนี้อาจไม่ดีพอสำหรับตรวจแถบแสงที่จางมาก แต่มีข้อดีคือประหยัดเนื่องจากมีราคาถูก

2. Transmitted light เป็นเครื่องที่ส่องแสงมาจากทางด้านล่างของแผ่น gel ทั้งนี้แผ่น gel ต้องวางลงบนแผ่นแก้วที่แสง UV สามารถผ่านได้ โดยที่ลักษณะเครื่องจะเป็นกล่องที่มีหลอด UV อยู่ภายในเครื่องชนิดนี้เรียกว่า UV transilluminator

การตรวจดูแถบ DNA ต้องทำในห้องมืดหรือใช้อุปกรณ์กั้นไม่ให้แสงแดดไปบดบังแสง fluorescent จากแถบ DNA และผู้ตรวจต้องสวมแว่นตาทุกครั้งเพื่อป้องกันอันตรายจากแสง UV

การถ่ายรูปแถบ DNA ทำได้หลายลักษณะได้แก่

1. ใช้กล้อง Polariod MP4 ที่มี red filter สำหรับกรองแสงสีแดงที่เกิดจาก UV lamp ติดอยู่ด้วย ฟิล์มที่ใช้ได้ดีคือชนิด 667 หรือชนิด 57 (3,000 ASA) ปัจจุบันได้มีการผลิตกล้อง Polariod ชนิดที่ทำขึ้นมาเพื่อถ่ายแบบ DNA จากเครื่อง UV transilluminator โดยตรงทำให้ถ่ายภาพได้ง่ายขึ้น

2. ใช้เครื่องมือสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยเครื่อง UV transilluminator และ กล้องถ่ายรูปพร้อมระบบ thermal printer โดยเครื่องจะมีลักษณะเป็นตู้เมื่อใส่แผ่น gel เข้าไปในตู้แล้วปิดประตูตู้หลังจากนั้นเปิดเครื่อง UV transilluminator จะมองเห็นภาพบนจอภาพซึ่งภาพนั้น สามารถที่จะปรับความคมชัดและสามารถปรับแสงให้มีความเข้มหรือจางได้ตามต้องการ หลังจากกดปุ่มถ่ายภาพอัตโนมัติแล้วภาพจะถูกพิมพ์ออกมาบนกระดาษได้ทันที

3. ใช้กล้องถ่ายภาพมาตรฐาน วิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับเนื่องจากให้ภาพคมชัด มีความคงทนสามารถเก็บได้นาน โดยการถ่ายภาพทำในห้องมืด มักใช้กล้องถ่ายรูปขนาด

เลนส์ 35 nm ใช้ฟิล์มขาว – ดำ ความไวแสง ISO100 – 200 เปิดหน้ากล้องที่ f (focus) 5.6 ใช้ red filter และเวลาถ่ายภาพประมาณ 45 – 100 วินาที/ภาพ หลังจากถ่ายภาพแล้วต้องนำฟิล์มไปล้างและอัดภาพ

Whatman 3MM [6]

Whatman 3MM คือกระดาษโครมาโตกราฟีที่ผลิตจากบริษัท Whatman ซึ่งทำจากเส้นใยเซลลูโลส (cellulose) ชนิดพิเศษมีความบริสุทธิ์สูง นอกจากนี้ยังมีการควบคุมคุณภาพในการผลิตอย่างดี เป็นกระดาษที่มีความหนาปานกลางประมาณ 0.34 mm โดยอัตราการไหลผ่าน (flow rate) คือ 130mm/30 min นำมาใช้ในงานทางห้องปฏิบัติการทางเคมีทั่วไปเช่นโครมาโตกราฟี (chromatography) และการทำ electrophoresis

## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จำนงค์ นพรัตน์ ได้ศึกษาการตรวจธาลัสซีเมียทางอณูชีววิทยาซึ่งธาลัสซีเมียเป็นความผิดปรกติทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในประเทศแถบเอเชียอาคเนย์ อินเดีย ทะเลจีนใต้ และเมดิเตอร์เรเนียน เกิดจากการสังเคราะห์สายโกลบินลดลง หรือสังเคราะห์ไม่ได้เลย ทำให้เกิดภาวะเลือดจาง ความผิดปรกติระดับอณูของธาลัสซีเมียมีความหลากหลายมาก α-thalassemia ส่วนใหญ่เกิดจากยีน α globin ขาดหายไปเป็นท่อนยาวหลายกิโลเบส α-thalassemia แบ่งออก ได้เป็น 2 ชนิด คือ α-thalassemia 1หรือ $\alpha^0$-thalassemia α-thalassemia ชนิดนี้ เกิดจากยีนα ทั้ง 2 โลไซ (α1 และ α2) ขาดหายไป และα-thalassemia 2 หรือ $\alpha^+$-thalassemia ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไปของยีนα เพียงโลไซเดียว การตรวจยีนα-thalassemia สามารถทำได้ด้วยเทคนิค PCR ของยีน α globin โดยสร้าง primer ให้คร่อมรอยต่อของยีนที่ขาดหายนั้น แล้วนำผลPCR ที่ได้มาวิ่งในสนามไฟฟ้าบนแผ่น agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide ส่วน β-thalassemia ส่วนใหญ่จะเกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ปัจจุบันมีรายงานแล้วเกือบ 200 ชนิด ที่ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ mRNA หรือการสังเคราะห์โปรตีน ของ β globin ผิดปรกติ มีน้อยมากที่เกิดจากยีนขนาดใหญ่ขาดหายไป การตรวจยีน β-thalassemia จะใช้วิธี oligoprobe hybridization ของดีเอ็นเอที่ได้จาก PCA โดยโอลิโกโพรบอาจจะติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ดิกอกซิจินิน ไบโอติน ที่ตรวจจับโดยสารจำเพาะ ที่พ่วงอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ แล้วอ่านผลด้วยการทำออโตราดิโอกราฟ หรือดูสีจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเทรท ส่วน บีตาธาลัสซีเมียที่เกิดจากยีนขาดหายไปและเป็นชนิดที่พบได้บ่อย เช่น ขาดหายไป 619 คู่เบส หรือ ขาดหายไป 3,485 คู่เบส จะใช้วิธี PCR คร่อมบริเวณรอยต่อของยีนที่ขาดหาย

เช่นเดียวกับวิธีตรวจยีน α-thalassemia การศึกษาทางอณูวิทยาโดยใช้วิธีการดังกล่าวข้างต้น ทำให้ทราบถึงความถี่และชนิดการกลายพันธุ์ของธาลัสซีเมียในประเทศไทย ซึ่งเป็นประโยชน์ในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรค โดยการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด [7]

Cassol S. และคณะได้ศึกษาการตรวจการติดเชื้อ HIV ที่เกิดขึ้นระหว่างการคลอดโดยวิธี PCR โดยวิธีการนี้ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายซึ่งต้องมีการกำหนดให้อยู่ภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยมีสภาวะดังต่อไปนี้ 50 µl aliquots of whole blood ประกอบด้วย HIV proviral DNA ระดับต่ำ ๆ (4 – 1,024 copies per 100,000 nucleated cells) ถูกหยดลงบนกระดาษกรองทำให้แห้งและ ภายใต้การควบคุมของ ความร้อน , ความชื้น และเก็บรักษาได้นานที่อุณหภูมิห้อง หลังจาก DNA ถูกค้นพบและเพิ่มจำนวนด้วย primer ที่เป็น human leukocyte antigen DQα และ HIV – specific sequence เก็บรักษาที่ 37 °c ความชื้น 60 % เก็บได้นาน 7 วัน , ที่ 22 °c ขีดจำกัดในการตรวจหา HIV น้อยกว่า ทุก test โดยอยู่ในช่วง 4 – 16 HIV copies per 100,000 cells การ fixation ใน 70% ethanol ช่วยการ amplification HIV DNA ระดับต่ำ ๆ ได้ดีขึ้นและลดความเสี่ยงของการเกิด biohazard dried blood spots จะเป็นการเตรียมตัวอย่างเลือดแบบใหม่สำหรับการทดสอบหาเชื้อ HIV โดยวิธี PCR โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ห่างไกลที่ไม่มีกระบวนการการเก็บตัวอย่างอย่างรวดเร็ว เช่นการแช่เย็นตัวอย่างเลือด [8]

Gupta B. และคณะได้ศึกษาเกี่ยวกับการตรวจหา DNAของ HBV (hepatitis B virus) ซึ่งอยู่ในซีรั่มของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากการตรวจหา DNAของ HBVเป็นการตรวจ viral marker ที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด โดยการเก็บตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood) บนกระดาษแล้วนำมาสกัด DNA ของเชื้อ HBV ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจได้น้อยที่สุดถึงอนุภาคไวรัส 10 อนุภาค ปัญหาของวิธีการนี้คือมีราคาแพงแต่มีความคงทนในการเก็บ viral marker และการขนส่งยังปลอดภัยจากการติดเชื้อต่างๆ [9]

# วิธีดำเนินการวิจัย

## ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

### 1.รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study design) โดยการศึกษาความคงตัวของกระดาษ Whatman 3MM ในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งเพื่อตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type)

### 2. ตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัย

กลุ่มตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาความคงตัวของกระดาษ Whatman 3MM ได้มาจากตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA จากผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 จำนวน 5 ราย และ β-thalassemia จำนวน 5 ราย ที่ได้จากการตรวจที่หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างวันที่ 23-26 มีนาคม พ.ศ.2550 ซึ่งผ่านการตรวจด้วยเทคนิค PCR และ HPLC นอกจากนั้นยังมีเลือดผู้ที่เป็น Hb E จำนวน 5 ราย คนปกติจำนวน 5 ราย ซึ่งผ่านการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis รวมทั้งสิ้นจำนวน 20 ตัวอย่าง

### 3. วิธีการสุ่มตัวอย่าง

เป็นการสุ่มแบบเจาะจง (Purposive sampling) โดยคัดเลือกจากกลุ่มตัวอย่างผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type) จำนวน 5 ราย β-thalassemia จำนวน 5 ราย Hb E จำนวน 5 ราย และคนปกติที่ได้รับการตรวจคัดกรองแล้วว่าไม่เป็นธาลัสซีเมียจำนวน 5 ราย รวมเป็นจำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง

### 4. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

4.1 อุปกรณ์ในการหยดเลือดลงบนกระดาษ มีดังนี้

- ปิเปตต์อัตโนมัติชนิดปรับขนาดได้ ขนาด 20-200 ไมโครลิตร โดยปรับปริมาตรเป็น 40 ไมโครลิตร

4.2 การสกัด DNA จากกระดาษ Whatman 3MM และ เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ใช้อุปกรณ์ดังนี้

- Heat Block (Biosan, lapvia)

- Centrifuge (Hettich, Germany)
- ชุด Electrophoresis (Helena, USA)
- ชุดถ่ายภาพ UV transluminator (UVP, USA)
- เครื่องอัตโนมัติ Thermal cycler (Perkin Elmer, USA)

## 5. ขั้นตอนการทำวิจัย

### 5.1 ขั้นตอนการทำให้เลือดแห้ง

1. หยดเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษ Whatman 3MM
2. เมื่อตัวอย่างเลือดที่หยดลงบนกระดาษแห้งแล้ว นำไปเก็บในถุง zip-lock พร้อมทั้งใส่สารกันความชื้น และเก็บไว้ในที่แห้ง

### 5.2 ขั้นตอนการสกัด DNA

5.2.1 วิธีการสกัด DNA จากกระดาษ Whatman 3MM และจากเลือดครบส่วนผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA

1. ใช้กรรไกรตัดกระดาษ Whatman 3MM จำนวน 1 วง และจากเลือดครบส่วนผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ปริมาตร 40 ไมโครลิตรใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม 1%Triton X-100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันเบาๆ โดยวิธี inverse
3. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสที่อยู่ข้างบนทิ้งให้มากที่สุด
4. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ โดยวิธี inverse
5. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสที่อยู่ข้างบนทิ้งให้มากที่สุด
6. เติม Chelex® 1 หยด และน้ำกลั่นปริมาตร 110 ไมโครลิตร
7. นำไปอบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมงหรือข้ามคืน
8. นำไปต้มเป็นเวลา 5 – 10 นาที
9. นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นจึงเตรียมนำไปทำ PCR

**5.3 ขั้นตอนการทำ PCR**

1. การเตรียม mastermix สำหรับการทำ PCR 1 ราย มีดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| - 10X buffer | 1 | ไมโครลิตร |
| - 2 mM dNTP | 1 | ไมโครลิตร |
| - 5 μM primer | 1 | ไมโครลิตร |
| - Q solution | 2 | ไมโครลิตร |
| - *Taq* DNA Polymerase | 0.1 | ไมโครลิตร |
| - DNA extraction | 5 | ไมโครลิตร |

2. การทำ PCR

ทำด้วยเครื่องอัตโนมัติ Thermal cycler ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที
2. Annealing ใช้อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 45 วินาที
3. Extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที

การเพิ่มจำนวนทำทั้งหมด 40 รอบ

**5.4 ขั้นตอนการเตรียม 2% Agarose gel**

1. ชั่งผง agarose 1.2 กรัม แล้วเติม 1XTBE buffer 60 มิลลิลิตร
2. นำไปหลอมโดยใช้ Hot plate รอจนกว่าสารละลายจะใส
3. จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พออุ่นๆ
4. เท agarose gel ลงในช่องเตรียม gel แล้วเสียบหวีลงไปเพื่อให้เกิดเป็นหลุม gel จากนั้นรอให้ gel แข็ง จึงนำไปใช้ run electrophoresis ได้

**5.5 ขั้นตอนการทำ electrophoresis**

1. นำ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR มา 10 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในหลุม agarose gel
2. Run electrophoresis ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ 30 นาที
3. นำแผ่น agarose gel ที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลาประมาณ 10 นาที
4. เมื่อครบเวลานำแผ่น agarose gel มาล้างด้วยน้ำกลั่น
5. ตรวจดูแถบ DNA โดยใช้เครื่อง UV translluminator

## 6. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลของการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR มาศึกษาความคงตัวของการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งด้วยกระดาษ Whatman 3MM โดยเก็บเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน โดยใช้สถิติ Chi Square test

# ผลการวิจัย

จากการศึกษากระดาษ Whatman 3MM ในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งซึ่งใช้ตัวอย่างเป็นเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA จากกลุ่มตัวอย่างจำนวนทั้งสิ้น 20 ราย เพื่อดูความคงตัวของเลือดที่เก็บบนกระดาษ Whatman 3MM เป็นระยะเวลาตั้งแต่เดือนมีนาคม ถึงเดือนสิงหาคม รวมเป็นระยะเวลา 6 เดือน

**ความคงตัวของเลือดในการเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษ Whatman 3MM**

จากการศึกษาความคงตัวของเลือดในการเก็บตัวอย่างบนกระดาษ Whatman 3MM เมื่อทำการหยดตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากเลือดกลุ่มตัวอย่าง α-thalassemia 1 (SEA type) จำนวน 5 ราย β-thalassemia จำนวน 5 ราย Hb E จำนวน 5 ราย และคนปกติจำนวน 5 ราย และทำการตรวจด้วยเทคนิค PCR และทำการตรวจซ้ำทุกๆ เดือน ตั้งแต่เดือนมีนาคม - สิงหาคม พ.ศ.2550 พบว่า การเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษ Whatman 3MM สามารถเก็บรักษาได้อย่างน้อย 6 เดือน ดังแสดงในตาราง 1 ผลการตรวจจากตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษ Whatman 3MM จำนวนทั้งสิ้น 20 ราย สามารถอ่านผลได้ถูกต้อง ร้อยละ 100 โดยตัวอย่างเลือดของ α-thalassemia 1 (SEA type) ปรากฏแถบ DNA 2 แถบที่ 314 bp และ 188 bp และสำหรับตัวอย่างเลือด β-thalassemia, Hb E, และคนปกติ ปรากฏแถบ DNA 1 แถบที่ 314 bp ในเดือนมีนาคม เมษายน พฤษภาคม กรกฎาคม สิงหาคม ส่วนเดือน มิถุนายน ผลการตรวจตัวอย่างเลือดแห้งอ่านผลถูกต้อง 18 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 90

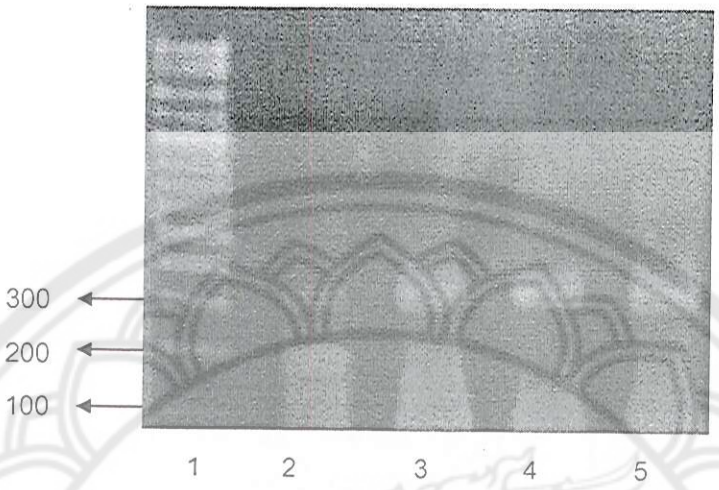
จากการเปรียบเทียบกับผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างเลือดแห้งที่เก็บบนกระดาษ Whatman3MM กับตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA โดยใช้สถิติ Chi Square test พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P-value* = 0.160)

ตาราง 1 แสดงความคงตัวของเลือดในการเก็บตัวอย่างเลือดด้วยกระดาษ Whatman 3MM โดยทำการตรวจตั้งแต่เดือนมีนาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2550

| เดือน | จำนวนผลการตรวจจากตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษ Whatman 3MM (n=20) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | α-thalassemia1 (n=5) | β-thalassemia (n=5) | Hb E (n=5) | คนปกติ (n=5) | รวม (n=20) |
| มีนาคม | 5 | 5 | 5 | 5 | 20 |
| เมษายน | 5 | 5 | 5 | 5 | 20 |
| พฤษภาคม | 5 | 5 | 5 | 5 | 20 |
| มิถุนายน | 5 | 4 | 4 | 5 | 18 |
| กรกฎาคม | 5 | 5 | 5 | 5 | 20 |
| สิงหาคม | 5 | 5 | 5 | 5 | 20 |

**การอ่านผลการตรวจ α-thalassemia 1(SEA type) ด้วยเทคนิค PCR จากแถบ DNA**

การศึกษาการใช้ตัวอย่างเลือดแห้งเพื่อตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR เมื่อเปรียบเทียบการอ่านผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) โดยการใช้ตัวอย่างเลือดแห้งที่เก็บบนกระดาษจาก Whatman 3MM และเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันกับการเก็บตัวอย่างเลือดแห้ง พบว่าการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ตัวอย่างเลือดแห้งที่เก็บบนกระดาษ Whatman 3MM และเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ให้ผลตรงกันที่แถบ DNA ที่ 314 bp และ 188 bp และจากการตรวจ non α-thalassemia 1 ด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ตัวอย่างเลือดแห้งที่เก็บบนกระดาษ Whatman 3MM และเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ให้ผลตรงกันที่แถบ DNA ที่ 314 bp ดังแสดงในรูป 1 และรูป 2




รูป 1 แสดงผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA

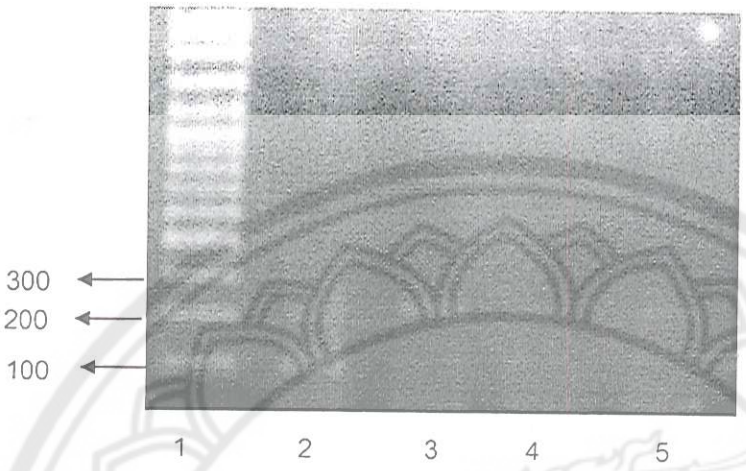
1 = marker

2 = ผล α-thalassemia 1 (SEA type) จากเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA

3 = ผล β-thalassemia เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA

4 = ผล Hb E เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA

5 = ผลคนปกติ เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA




รูป 2 แสดงผลการตรวจ $\alpha$-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR ของกระดาษ Whatman 3 MM

1 = marker

2 = ผล $\alpha$-thalassemia 1 (SEA type) ของกระดาษ Whatman 3MM

3 = ผล $\beta$-thalassemia ของกระดาษ Whatman 3MM

4 = ผล Hb E ของกระดาษ Whatman 3MM

5 = ผล คนปกติ ของกระดาษ Whatman 3MM

# บทที่ 3
# ข้อวิจารณ์

จากการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งเพื่อตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) โดยใช้เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ทั้งสิ้นจำนวน 20 ตัวอย่าง หยดลงบนกระดาษ Whatman 3MM โดยใช้เลือดจากผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type)เป็นผล positive case และใช้เลือดผู้ที่เป็น β-thalassemia, Hb E และคนปกติ เป็นผล negative case แล้วทำการตรวจด้วยเทคนิค PCR โดยทำการตรวจซ้ำทุกเดือนเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน คือตั้งแต่เดือนมีนาคม – สิงหาคม พ.ศ.2550 ซึ่งผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เลือดจากผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type) จะปรากฏแถบ DNA 2 แถบ ที่ 314 bp และ 188 bp และผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เลือดจากผู้ที่เป็น β-thalassemia, Hb E และคนปกติ จะปรากฏแถบ DNA 1 แถบ ที่ 314 bp เพื่อแสดงถึงความถูกต้องและความจำเพาะของเทคนิค PCR ในการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) สำหรับผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ตัวอย่างเลือดแห้งที่เก็บบนกระดาษ Whatman 3MM เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง โดยพบว่าในเดือนมีนาคม – พฤษภาคม พ.ศ.2550 ในผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type) β-thalassemia Hb E และ คนปกติ ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องสำหรับการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) ถูกต้องทุกราย ในเดือนมิถุนายน พ.ศ.2550 ในผู้ที่เป็น α-thalassemia 1(SEA-type) และคนปกติ ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องทุกราย ส่วนในผู้ที่เป็น β-thalassemia และ Hb E ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องกลุ่มละ 4 ราย ในเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2550 ในผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type),β-thalassemia , Hb E และ คนปกติ ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องสำหรับการตรวจหาα-thalassemia 1 (SEA type) ถูกต้องทุกราย

ผลการตรวจในเดือนมิถุนายนพบว่าไม่สามารถตรวจได้ ในผู้ที่เป็น β-thalassemia และ Hb E อย่างละ 1 ราย โดยเมื่อเปรียบเทียบกับผลการผลในเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2550 ในผู้ที่เป็นβ-thalassemia และ Hb E ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องทุกราย อาจมีสาเหตุเนื่องจากความผิดพลาดจากคณะผู้วิจัย โดยอาจเกิดจากขั้นตอนการสกัด DNA ในการดูดส่วนน้ำใสอาจดูดเอาส่วน DNA ออกไป และในขั้นตอนการต้มฝาของ microcentrifuge tube อาจมีการเปิด ทำให้น้ำที่ผสม DNA ระเหยออกไปจนหมดซึ่งหลังจากขั้นตอนการสกัด DNA ทางคณะผู้วิจัยไม่ได้ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้จึงไม่สามารถยืนยันได้ว่าเกิดความผิดพลาดจากขั้นตอนการสกัด DNA

หรือในขั้นตอนการทำ PCR อาจมีการทำ mastermix PCR ไม่ได้สัดส่วนที่เหมาะสม หรือในขั้นตอนการ run gel electrophoresis อาจเกิดจากการหยอด PCR product ลงในช่อง gel แล้วเกิดการฟุ้งกระจายขึ้น

โดยจากผลการตรวจดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความคงตัวของตัวอย่างเลือดแห้งที่เก็บบนกระดาษ Whatman 3MM สามารถใช้ในการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR ได้เป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 6 เดือน และแสดงถึงความจำเพาะของเทคนิค PCR ในการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องในผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type) ทุกราย

ประโยชน์ของการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษ Whatman 3MM เพื่อตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) คือ ใช้เลือดเพียงปริมาณเล็กน้อยโดยการเจาะจากปลายนิ้วหรือการเจาะจากเส้นเลือดดำที่ข้อพับบริเวณแขน ทำให้สะดวกในการเจาะเก็บ และเมื่อหยดเลือดลงบนกระดาษ Whatman 3MM แล้วสามารถทิ้งไว้ให้แห้งได้เองที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องมีการอบ และเก็บตัวอย่างเลือดแห้งใส่ในถุง zip-lock สีชาโดยใส่สารกันความชื้นเพื่อเป็นการรักษาสภาพของกระดาษ Whatman 3MM และเป็นการป้องกันเชื้อราที่อาจจะเกิดขึ้นบนกระดาษ Whatman 3MM นอกจากนั้นการนำส่งตัวอย่างเลือดแห้งไปยังห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลต่างๆ ยังมีความสะดวกมากกว่าการนำส่งตัวอย่างที่เป็นเลือดครบส่วน

ว QP
Q3
.5
ว3245
2550



สำนักหอสมุด

# บทที่ 4

## สรุป และข้อเสนอแนะ

- 5 JUL 2011

ผลการศึกษาความคงตัวของการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งจากกระดาษ Whatman 3MM โดยคุณภาพของกระดาษยังคงมีประสิทธิภาพที่ดีในการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน จากการทำวิจัยในกลุ่มตัวอย่างทั้งสิ้นจำนวน 20 ราย โดยแบ่งออกเป็น α-thalassemia 1 (SEA-type) จำนวน 5 ราย, β-thalassemia จำนวน 5 ราย ซึ่งได้จากการตรวจที่หน่วย วิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก และ Hb E จำนวน 5 ราย คนปกติ 5 รายซึ่งได้จากการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ จากการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษ Whatman 3MM เดือน มีนาคม เมษายน พฤษภาคม กรกฎาคม และสิงหาคม พ.ศ.2550 โดยทำการตรวจซ้ำทุกเดือน พบว่าในผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type) , β-thalassemia, Hb E และ คนปกติ ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องสำหรับการตรวจหาα-thalassemia 1 (SEA type)ครบทุกราย คิดเป็นความถูกต้องร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ด้วยเทคนิค PCR

ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2550 ในผู้ที่เป็น α-thalassemia 1 (SEA type)และ คนปกติ พบว่าให้ผลการตรวจที่ถูกต้องสำหรับการตรวจหาα-thalassemia 1 (SEA type) อย่างละ 5 ราย ในผู้ที่เป็น β-thalassemia และ Hb E ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องสำหรับการตรวจหาα-thalassemia 1 (SEA type) อย่างละ 4 ราย และไม่สามารถตรวจได้อย่างละ 1 ราย คิดเป็นความถูกต้องร้อยละ 90

การเก็บตัวอย่างเลือด α-thalassemia 1 (SEA type) มีความคงตัวในการเก็บตัวอย่างเลือดแห้งได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจจากการใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ด้วยเทคนิค PCR เป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 6 เดือน จากผลการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างตัวอย่างเลือดแห้งจาก กระดาษ Whatman 3MM และ เลือดครบส่วนที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA ตั้งแต่เดือนมีนาคม จนถึงเดือนสิงหาคม พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P-value* = 0.160)

**ดังนั้นกระดาษ Whatman 3MM จึงสามารถนำมาใช้เก็บตัวอย่างเลือด เพื่อทำการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยเทคนิค PCRได้ดี อีกทั้งกระดาษ Whatman 3MM ยังมีราคาถูกสะดวก และมีความคงตัวของตัวอย่างเลือดเป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 6 เดือน**

# บรรณานุกรม


1. อานนท์ บุณยะรัตเวช (2535) โลหิตวิทยาเม็ดเลือดแดง.(พิมพ์ครั้งที่ 1 ).กรุงเทพฯ:ห้างหุ้นส่วนจำกัด พันนี่ พับบลิชชิ่ง.
2. ปราณี ฟูเจริญ สุทัศน์ ฟูเจริญ (2537) ตำราโลหิตวิทยาการวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. (ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ:บริษัท ที.พี.พริ้นท์ จำกัด.
3. เนตรนภิส วรรณิสสร. (2548) คู่มือการสอนชีวเคมี.(พิมพ์ครั้งที่ 6)
4. วาสนา ศิริรังษี วีระพงษ์ ลิตานนท์ (2539) วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน (พิมพ์ครังที่ 1).เชียงใหม่:โรงพิมพ์พงษ์สวัสดิ์ การพิมพ์
5. ปราณี ฟูเจริญ. (2541) ธาลัสซีเมียการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR (พิมพ์ครั้ง ที่ 1) กรุงเทพฯ:โครงการวิจัยธาลัสซีเมียสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
6. Whatman 3MM .Retrieved March 12, 2007, from http://www.whatman.com/product/?pageID=7.27.16
7. Nopparatana, C. (1998) Molecular diagnosis of thalassemias. Songkla Med J. 16 (3),145 -159.
8. Cassol, S., Salsa, T., Gili,M. J, Montpetit, M., Rudnik, J., Tidiane, C., & O'Shaughnessy, M. V. (1992) Stability of dried blood spot specimens for detection of human immunodeficiency virus DNA by Polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology. 30(12),3039-3042.
9. Gupta, B., Jayasuryan, N., & Jameel, S. (1992) Direct detection of hepatitis B virus from dired blood spots by polymerase chain reaction amplication.Journal of Clinical Microbilogy. 30(8),1913-1916.

# ภาคผนวก

**1. การเตรียม 1X TBE Buffer**

| | | |
|---|---|---|
| Tris base | 10.8 | กรัม |
| Boric acid | 5.5 | กรัม |
| Disodium EDTA | 0.7 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

1X TBE Buffer นี้เมื่อเตรียมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**2. การเตรียม 0.5% Triton X-100**

| | | |
|---|---|---|
| Triton X-100 | 0.5 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

น้ำยา 0.5% Triton X-100 นี้เมื่อเตรียมแล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**3. การเตรียม Ethidium bromide**

| | | |
|---|---|---|
| EThidium bromide (10mg/ml) | 7 | ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น | 150 | มิลลิลิตร |

**4. การเตรียม 2% Agarose gel**

| | | |
|---|---|---|
| Agarose | 1.3 | กรัม |
| 1X TBE Buffer | 65 | มิลลิลิตร |

นำไปหลอมในเตาไมโครเวฟให้ ผง Agarose หลอมให้หมด จากนั้นวาง Agarose gel ที่หลอมแล้วไว้ในอุณหภูมิห้องให้มีอุณหภูมิ ประมาณ 65 องศาเซลเซียส จึงนำไปเตรียมแผ่นเจลต่อไปโดยแผ่นเจลที่เตรียมเสร็จแล้วสามารถเก็บไว้ได้โดยแช่ใน 1X TBE Buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม **Loading buffer**

| | | |
|---|---|---|
| Bromophenol blue | 25 | มิลลิกรัม |
| Sucrose | 4 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 10 | มิลลิลิตร |

Loading buffer นี้เมื่อเตรียมเสร็จแล้วให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. การเตรียม **mastermix**

| | | |
|---|---|---|
| 10X buffer | 1 | ไมโครลิตร |
| 2 mM dNTP | 1 | ไมโครลิตร |
| 5 µM primer | 1 | ไมโครลิตร |
| Q solution | 2 | ไมโครลิตร |
| *Taq* DNA Polymerase | 0.1 | ไมโครลิตร |