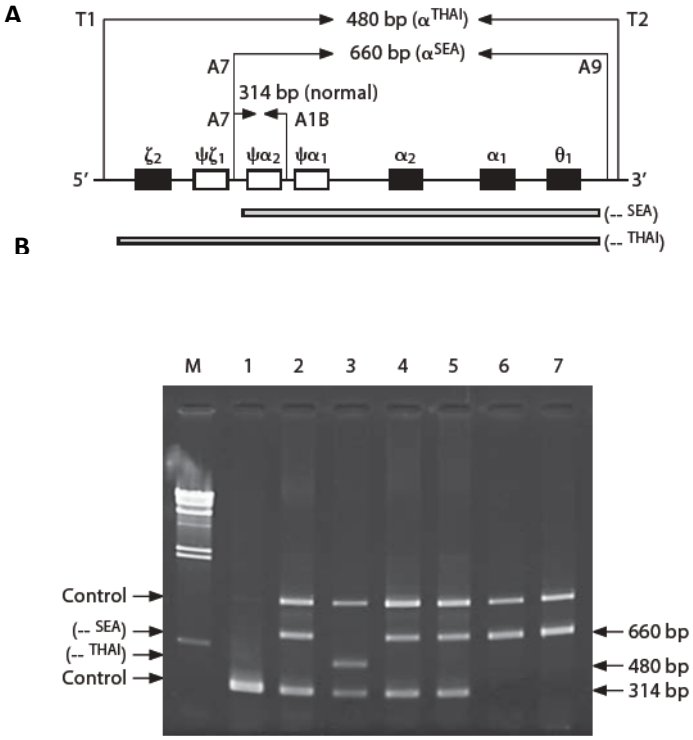
การตรวจวินิจฉัยพาหะของโรคอัลฟ่าและเบต้าธาลัสซีเมียโดยวิธีอณูชีววิทยา

อ.ดร.จิตรดา เพชรฟอง

การตรวจวิเคราะห์พาหะของอัลฟ่าธาลัสซีเมียในระดับยีน มีวัตถุประสงค์เพื่อวินิจฉัยพาหะ α-thalassemia 1 ในคู่สมรสหรือหญิงตั้งครรภ์และสามี เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อการจะมีบุตรเป็น Hb Bart's hydrops fetalis ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงมากที่สุด สาเหตุส่วนใหญ่ของอัลฟ่าธาลัสซีเมียเกิดจากการขาดหายไปของยีนอัลฟ่าโกลบิน หากมีการขาดหายไปหนึ่งยีนหรือสองยีนบนโครโมโซมข้างเดียวกันทำให้เกิดเป็นพาหะ α-thalassemia 2 หรือ α-thalassemia 1 ตามลำดับ ซึ่งพาหะของอัลฟ่าธาลัสซีเมียทั้งสองชนิดไม่มีอาการทางคลินิกและไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้โดยการตรวจวิเคราะห์ชนิดฮีโมโกลบิน (hemoglobin typing) α-thalassemia 1 ในคนไทยที่พบได้บ่อยคือชนิด Southeast Asian (SEA) deletion และ THAI deletion ส่วนความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α-thalassemia 2 ในคนไทยที่พบได้บ่อยคือชนิด 3.7 kb deletion และ 4.2 kb deletion โดยเทคนิคที่นิยมใช้ตรวจคือ Gap PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจการขาดหายของยีนขนาดใหญ่ การขาดหายไปของยีนทำให้สาย DNA สั้นลง เมื่อใช้ primer ที่ออกแบบให้คร่อม DNA ส่วนที่ขาดหายไป จะสามารถเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนนี้ได้ เทคนิคนี้สามารถประยุกต์เป็น Multiplex Gap PCR ได้โดยใช้ primer หลายๆ คู่เพื่อตรวจหาการขาดหายไปของยีน α-globin ชนิดต่างๆ ในปฏิกิริยาเดียว แล้วติดตามการเกิด PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis (รูปที่ 1)

ปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาใช้เทคนิคอื่นๆ ในการตรวจยีนของอัลฟ่าธาลัสซีเมียนอกเหนือจากการใช้ conventional PCR เช่น การใช้ Relative quantitative PCR ซึ่งใช้ primer และ probe ที่จำเพาะต่อ SEA deletion, THAI deletion และยีนอัลฟ่าโกลบินปกติ โดย probe แต่ละชนิดถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเครื่องจะวัดสัญญาณแสงของสารเรืองแสงแต่ละชนิด วิธีนี้สามารถติดตามและจำแนกชนิดของ PCR product ที่เกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องอาศัยการทำ agarose gel electrophoresis



รูปที่ 1 A) แสดงการออกแบบ primer คร่อมยีนส่วนที่ขาดหายไปเพื่อตรวจวิเคราะห์ SEA และ THAI deletion ด้วยเทคนิค Gap PCR

B) แสดงการวิเคราะห์ PCR product ขนาดแตกต่างกันใน SEA และ THAI deletion ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ภายหลังการทำ Multiplex Gap PCR (1)

การตรวจในระดับยีนเพื่อหายีนผิดปกติที่เป็นสาเหตุของเบต้าธาลัสซีเมียมีวัตถุประสงค์เพื่อบอกชนิดของยีนผิดปกติของเบต้าธาลัสซีเมียในคู่สมรสหรือหญิงตั้งครรภ์และสามีที่มีความเสี่ยงต่อการจะมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง เช่น homozygous β-thalassemia และ β- thalassemia/Hb E disease เพื่อจะได้ทราบชนิดการกลายพันธุ์ที่อาจถ่ายทอดไปสู่ทารกในครรภ์ ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ

เบต้าธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจาก point mutation ของยีนเบต้าโกลบิน ความรุนแรงของโรคเบต้าธาลัสซีเมียขึ้นอยู่กับชนิดของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นว่ายังคงสร้างเบต้าโกลบินได้หรือไม่ ชนิดของการกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของเบต้าธาลัสซีเมียในคนไทยมีความหลากหลายมากกว่า 30 ชนิด แต่ที่พบมากที่สุดในคนไทยคือ codon 41/42 (-TTCT) รองลงมาคือ Codon 17 (A>T) เทคนิคที่ใช้ตรวจเป็นเทคนิคทาง PCR ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกัน ได้แก่

1) เทคนิค Reverse dot-blot hybridization (RDB) เป็นเทคนิคที่ตรวจจับ DNA ด้วยการใช้ probe ที่จำเพาะ โดยออกแบบและสังเคราะห์ Allele specific oligonucleotide (ASO) probe ที่จำเพาะต่อยีนกลายพันธุ์แต่ละชนิด นำมายึดติดบนแผ่นไนลอนเมมเบรน ส่วน DNA ที่ต้องการตรวจจะถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR และติดฉลากด้วยสารที่ทำให้เกิดสี นำมาทำปฏิกิริยา (hybridization) กับ ASO probe บนเมมเบรนดังกล่าว แล้วตรวจสอบปฏิกิริยาโดยการทำ color detection วิธีนี้สามารถตรวจพบความผิดปกติของยีนเบต้าโกลบินได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว

2) เทคนิค Amplification refractory mutational system (ARMS-PCR) หรือ Allele specific PCR (ASPCR) เป็นการใช้ primer ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อ mutation ต่างๆ ที่ต้องการตรวจและ primer สำหรับยีนเบต้าโกลบินปกติที่ตำแหน่งเดียวกัน แล้วติดตามการเกิด PCR product ของยีนกลายพันธุ์ด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งสามารถบอกได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีนเป็นแบบ heterozygous หรือ homozygous เทคนิคนี้สามารถประยุกต์เป็น Multiplex PCR ได้โดยใช้ primer หลายๆ คู่ที่ออกแบบให้ได้ PCR product ขนาดต่างกันเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเบต้าโกลบินชนิดต่างๆ ในปฏิกิริยาเดียว นอกจากวิธีดังกล่าวในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมกับการทำ PCR เพื่อความสะดวกรวดเร็วในการตรวจ เช่น การใช้เทคนิค real-time PCR ร่วมกับ dissociation curve analysis หรือ high-resolution melting analysis (HRMA)

3) เทคนิค DNA sequencing ซึ่งเป็นการตรวจลำดับเบสในยีน หลักการที่นิยมใช้คือ Sanger dideoxynucleotide sequencing โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวน DNA ในส่วนที่ต้องการศึกษาลำดับเบส ซึ่งในปฏิกิริยามีการเติม dideoxynucleotides (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นตัวหยุดปฏิกิริยา DNA สายใหม่ที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดแตกต่างกันและที่ปลาย DNA มีสารเรืองแสงติดอยู่ซึ่งตรวจวัดได้ว่าเป็นเบสชนิดใดโดยผลลำดับเบสที่ได้จะแสดงออกมาในกราฟ chromatogram และนำมาเทียบกับลำดับเบสของยีนเบต้าโกลบินปกติ เทคนิค DNA sequencing จะเป็นประโยชน์ในกรณีที่สงสัยว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่พบไม่บ่อยและการตรวจไม่ครอบคลุม (2)

เอกสารอ้างอิง

(1) Sae-ung N1, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Alpha(0)-thalassemia and related disorders in northeast Thailand: a molecular and hematological characterization. Acta Haematol. 2007;117(2):78-82.

(2) คู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ. ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553