

การตรวจความแปรผันของยีนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของหมู่เลือด

ข้อมูลโดย ธนวรรณ อยู่ผาสุข

ปัจจุบันมีการค้นพบแอนติเจนของหมู่เลือดบนผิวเม็ดเลือดแดงที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคลมากกว่า 300 ชนิด ซึ่งแอนติเจนเหล่านี้มีความสำคัญในผู้ป่วยที่ได้รับเลือดจากผู้บริจาคโลหิต คือมีโอกาสสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดบนผิวเม็ดเลือดแดงในกรณีที่ผู้ป่วยไม่มีแอนติเจนชนิดนั้น

การทดสอบทางซีโรโลยี (Serology) ก่อนการให้เลือดแก่ผู้ป่วยประกอบด้วยการตรวจหมู่เลือด เอ บี โอ (ABO) และ อาร์เอช (Rh) การตรวจคัดกรองแอนติบอดี หากตรวจพบแอนติบอดีที่ไม่พึงประสงค์จากซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วย ต้องทำการตรวจเพื่อจำแนกชนิดของแอนติบอดีที่พบ พร้อมทั้งตรวจหาแอนติเจนของหมู่เลือดรองบนผิวเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเพื่อยืนยันความถูกต้อง และทำการตรวจความเข้ากันได้ของหมู่เลือด แต่ในการตรวจทางซีโรโลยีในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดในผู้ป่วยบางกลุ่ม เช่น ผู้ป่วยที่เพิ่งได้รับเลือดในระยะเวลาไม่เกิน 3 เดือน และกลุ่มผู้ป่วยที่ต้องรับเลือดเพื่อการรักษาอย่างต่อเนื่อง เพราะเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตที่ปนอยู่ในเลือดของผู้ป่วยจะทำให้การแปลผลในห้องปฏิบัติการผิดพลาด รวมถึงยังไม่มีนัยทางการตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดรองบนผิวเม็ดเลือดแดงได้ครบทุกหมู่เลือด ทำให้ไม่สามารถตรวจหาแอนติเจนของหมู่เลือดรองบนผิวเม็ดเลือดแดงได้อย่างครอบคลุมทุกแอนติเจน ซึ่งก่อให้เกิดความเสี่ยงจากแอนติเจนของผู้ให้ไปเป็นตัวกระตุ้นแอนติบอดีของผู้รับ ปรากฏการณ์ลักษณะนี้จะส่งผลให้หาเลือดที่เหมาะสมต่อผู้ป่วยได้ยากยิ่งขึ้น ซึ่งก่อปัญหาอย่างมากในกลุ่มผู้ป่วยที่ต้องรับเลือดอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีภาวะโลหิตจางจากโรคเม็ดเลือดแดงรูปเคียว (sickle cell anemia) โรคธาลัสซีเมียเบต้า (β -thalassemia) โรคไขกระดูกเสื่อม (Myelodysplastic Syndrome) และ โรคโลหิตจางจากกลไกทางภูมิคุ้มกันต่อตนเอง (autoimmune hemolytic anemia)

การแปรผันระดับนิวคลีโอไทด์เดี่ยว (single nucleotide variations, SNVs) ของยีนมีผลต่อ polymorphism ของแอนติเจนของหมู่เลือด ทำให้เกิดการแสดงออกของแอนติเจนหลายชนิด บางชนิดมีความสำคัญทางคลินิก นอกจากนี้ แอนติเจนแต่ละชนิดยังมีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ ตัวอย่างการเกิด single nucleotide polymorphisms (SNPs) ที่มีผลต่อการเกิดแอนติเจนของหมู่เลือด เช่น หมู่เลือดโคลตัน (Colton) มียีน *AQP1* ควบคุมการสร้างแอนติเจนโคลตันเอ (Co^a) และแอนติเจนโคลตันบี (Co^b) เกิดจากการมี SNPs ที่ตำแหน่ง 134C>T (Smith et al., 1994; Reid & Denomme, 2011) ความชุกของแอนติเจนโคลตันเอในคนทั่วไปประมาณร้อยละ 99.5 ส่วนแอนติเจนโคลตันบีมี

ความชุกประมาณร้อยละ 0.5 หมู่เลือดดีเอโก (Diego) มียีน *SLC4A1* ควบคุมการสร้างแอนติเจน ซึ่งเมื่อเกิด SNPs ที่ตำแหน่ง 2561C>T (Tournamille et al., 1995; Reid & Denomme, 2011) ทำให้เกิดการเปลี่ยนจากแอนติเจนดีเอโกบี (Di^b) (ความชุกในคนไทยประมาณร้อยละ 98.33) เป็นแอนติเจนดีเอโกเอ (Di^a) (ความชุกในคนไทยประมาณร้อยละ 1.67) ตามลำดับ หมู่เลือดลูเทอแรน (Lutheran) มียีน *BCAM* ควบคุมการสร้างแอนติเจน การเกิด SNPs ที่ตำแหน่ง 230G>A (Bruce et al., 1994; Reid & Denomme, 2011) ทำให้เกิดการเปลี่ยนจากแอนติเจนลูเทอแรนเอ (Lu^a) (ความชุกในคนผิวดำประมาณร้อยละ 5) เป็นแอนติเจนลูเทอแรนบี (Lu^b) (ความชุกในคนผิวดำประมาณร้อยละ 95) การเกิด SNPs บนยีน *ART4* ซึ่งควบคุมการสร้างแอนติเจนของหมู่เลือดดอมบร็อก (Dombrock) หากเกิดที่ตำแหน่ง 793A>G (Gubin et al., 2000; Reid & Denomme, 2011) จะมีผลต่อการเปลี่ยนแอนติเจนจากดอมบร็อกเอ (Do^a) (ซึ่งมีความชุกในประชากรไทยร้อยละ 14) เป็นดอมบร็อกบี (Do^b) (ซึ่งมีความชุกในประชากรไทยร้อยละ 86)

หมู่เลือด	ยีน	ตำแหน่งการกลายพันธุ์	แอนติเจนที่ปรากฏ
Rh	RHD	RHD*DEL1: 1227G>A	Del1
		RHD*DEL2: 3G>A	Del2
		RHD*DEL3: 53T>C	Del3
		RHD*DEL6: 251T>C	Del6
		RHD*DEL7: 410C>A	Del7
		RHD*DEL10: 1222T>C	Del10
		RHD*01N.15: 635G>T	Del15
		RHD*01N.16: 711delC	Del16
	RHCE	307C>T	c หรือ C
		676G>C	E หรือ e
Kell	KEL	578T>C	K หรือ k
Lutheran	BCAM	230G>A	Lu^a หรือ Lu^b
Diego	SLC4A1	2561C>T	Di^a หรือ Di^b
Colton	AQP1	134C>T	Co^a หรือ Co^b
Dombrock	ART4	793A>G	Do^a หรือ Do^b
Scianna	ERMAP	169G>A	Sc1 หรือ Sc2

ตาราง 1 แสดงตัวอย่างตำแหน่งการเกิด SNPs ที่มีผลต่อการเกิดแอนติเจนของหมู่เลือด

การตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดด้วยการทดสอบทางซีโรโลยี มีข้อจำกัดเรื่องราคา ความแรง (titer) ของน้ำยาแต่ละบริษัท และความสามารถในการตรวจแยก weak antigen ดังนั้นการนำเอาเทคโนโลยีทางชีวโมเลกุลมาตรวจแยกยีนระดับนิวคลีโอไทด์เดี่ยว จึงมีความจำเป็น ปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำมาใช้ทดสอบสำหรับแยกยีนระดับนิวคลีโอไทด์เดี่ยว เช่น MicroARRAY, Realtime-PCR, Next Generation Sequencing และ MassARRAY โดยแต่ละวิธีมีศักยภาพที่ต่างกัน เทคนิค MicroARRAY อาศัยหลักการของ Multiplex PCR ร่วมกับการเกิด hybridization กับ bead chips และตรวจการเกิด hybridization ด้วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ วิธีนี้มีความยืดหยุ่นน้อยและวิธีการค่อนข้างซับซ้อน เทคนิค Realtime-PCR เป็นการออกแบบในลักษณะของโพรบ (Taqman probe) โดยหนึ่งตัวอย่างจะสามารถตรวจได้หลายโพรบในหนึ่งปฏิกิริยา ซึ่งไม่มีความยืดหยุ่นมากพอ อีกทั้งโพรบที่ออกแบบอาจจะมึระยะเวลาการใช้งานที่สั้น เทคนิค Next Generation Sequencing เป็นวิธีที่มีศักยภาพสูง สามารถตรวจความผิดปกติของยีนที่ต้องการได้อย่างครอบคลุม แต่ราคาค่อนข้างสูง ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและฐานข้อมูลในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ที่ชัดเจน ส่วนเทคนิค MassARRAY อาศัยปฏิกิริยาการต่อนิวคลีโอไทด์เบสเดี่ยวและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์หัตถ์นำหนักมวลโมเลกุลแบบมัลติทอป (MALDI-TOF) ต่อนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนมีความยืดหยุ่นรองรับการออกแบบการตรวจตรวจวิเคราะห์ตำแหน่ง SNPs ที่ต้องการ มีความไวและความจำเพาะสูง กระบวนการวิเคราะห์รวมถึงการแปลผลสามารถทำได้ในเวลาอันสั้น จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาตรวจความแปรผันของยีนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของหมู่เลือด เพื่อคัดเลือกแอนติเจนให้ตรงกับผู้ป่วยที่ต้องการรับเลือดเพื่อรักษาและใช้สำหรับระบุชนิดของแอนติเจนของผู้บริจาคโลหิตทำให้ผู้ป่วยที่ต้องรับเลือดเป็นประจำมีความปลอดภัยมากขึ้นและลดการเกิดการกระตุ้นภูมิคุ้ม

หลักการทํางานของ MassARRAY

MassARRAY เป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมทั้งดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยอาศัยหลักการของ Multiplex PCR ร่วมกับ MALDI-TOF Mass Spectrometry เพื่อระบุการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมได้อย่างแม่นยำ

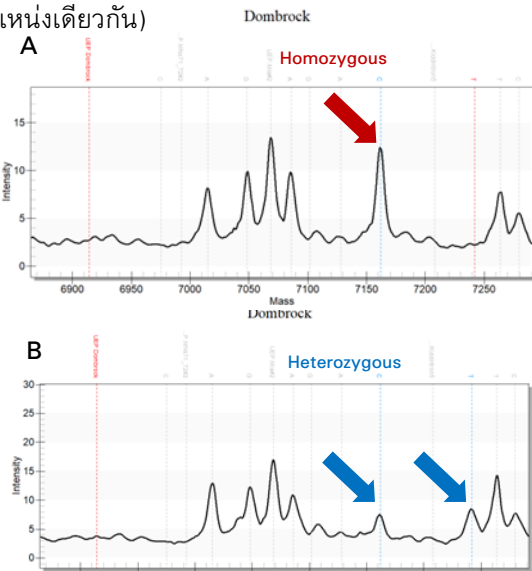
หลักการทํางานของเทคโนโลยีนี้ คือการวัด “น้ำหนักมวลโมเลกุล” ของชิ้นส่วนสารพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วยเบสพื้นฐาน 4 ชนิด ได้แก่ Adenine (A), Cytosine (C), Guanine (G) และ Thymine (T) แต่ละเบสจะมีน้ำหนักเฉพาะตัวแตกต่างกัน ดังนั้น เมื่อตำแหน่งของเบสเปลี่ยนไป เช่น การกลายพันธุ์ (SNP หรือ Variant site) น้ำหนักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอก็จะเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยเครื่อง MassARRAY



ภาพ 1 ความแตกต่างของมวลของสารพันธุกรรมสามารถตรวจจับได้โดยเทคโนโลยี MassARRAY

ตัวอย่างผลการตรวจแอนติเจนหมู่เลือดบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยเทคนิค MassARRAY

เทคโนโลยี MassARRAY มาพร้อมซอฟต์แวร์ที่ใช้งานง่าย เพิ่มความสะดวกในการวิเคราะห์ผล แสดงผลในรูปแบบกราฟและ Spectrum Plot โดยระบบจะแปลงข้อมูลจาก Mass Spectrometry Spectra ของ PCR Product เป็นค่ามวลโมเลกุล แสดงผลในรูปแบบ Peak Spectrum สามารถตรวจพบชนิดของเบสตำแหน่งเป้าหมายได้ทั้งลักษณะที่เป็น Homozygous (อ่านผลได้เป็นเบสชนิดเดียว) และ Heterozygous (อ่านผลได้เบส 2 ชนิดที่ตำแหน่งเดียวกัน)



ภาพ 2 แสดงผลการวิเคราะห์การแปรผันของยีน *ART4* หมู่เลือด Dombrock โดยโปรแกรมสามารถแสดงผลลักษณะที่เป็น Homozygous (ภาพ A) และ Heterozygous (ภาพ B)

เทคนิค	การทดสอบทางซีโรโลยี (Serology)	MassARRAY
หลักการ	ใช้ antibody จำเพาะจับกับ antigen และดูการเกิด agglutination	ตรวจการเกิด single nucleotide polymorphisms (SNPs) ของยีน เพื่อระบุชนิดของ antigen
ความละเอียด	ต่ำ (แยก allele ไม่ได้)	สูง (แยก allele ได้)
ความสามารถในการตรวจ weak/partial antigen	อาจตรวจไม่พบ	สามารถตรวจได้
ระยะเวลาในการรอผล	นาที-ชั่วโมง	>8 ชั่วโมง
ข้อจำกัด	ไม่มีน้ำยาสำหรับแอนติเจนบางชนิด	ต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะ (MassARRAY)
จุดเด่น	ตรวจการแสดงผลออกของแอนติเจนโดยตรง	- ตรวจได้หลาย antigen พร้อมกัน - มีความยืดหยุ่นและรองรับการออกแบบตำแหน่ง SNPs ที่ต้องการทดสอบ

ตาราง 2 เปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานการทดสอบทางซีโรโลยี (Serology) และเทคนิค MassARRAY ในการตรวจแอนติเจนหมู่เลือดบนผิวเม็ดเลือดแดง

อ้างอิง

- Smith BL, Preston GM, Spring FA, Anstee DJ, Agre P. Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1043-9. doi: 10.1172/JCI117418. PMID: 7521882; PMCID: PMC295159.
- Reid ME, Denomme GA. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sci*. 2011 Feb;44(1):65-72. doi: 10.1016/j.transci.2010.12.011. Epub 2011 Jan 22. PMID: 21257350; PMCID: PMC3058268.
- Tournamille, C., Colin, Y., Cartron, J. *et al*. Disruption of a GATA motif in the *Duffy* gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 10, 224–228 (1995). <https://doi.org/10.1038/ng0695-224>
- Bruce LJ, Anstee DJ, Spring FA, Tanner MJ. Band 3 Memphis variant II. Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Dia) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation Pro854→Leu. *J Biol Chem*. 1994 Jun 10;269(23):16155-8. PMID: 8206915.
- Gubin AN, Njoroge JM, Wojda U, Pack SD, Rios M, Reid ME, Miller JL. Identification of the dombrock blood group glycolprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2621-7. PMID: 11001920.



บริษัท ไลฟอมิกส์ จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533

Agena[®]
BIOSCIENCE



lifomicsth



@lifomics



www.lifomics.com