

การพัฒนาเทคนิคอัลลีลสเปซิงฟิสิกโวลีโกนิวคลีโอไทด์ต่อทบลงทสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจี  
ซิกพีดีชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Development Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot Technique to Detect Common  
*G6PD* Mutations in Thailand

Miss Patcharakorn Kiat-amornrak



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิคอัลลีสเปซิฟิกโพลิโกนิวคลีโอไทด์  
ดอทบลอตสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีชนิด  
ที่พบบ่อยในประเทศไทย

โดย

นางสาวพัชรากร เกียรติอมรรักษ์

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒน์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒน์)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อิศรางค์ นุชประยูร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.อาคม ไสงาม)

พัชรากร เกียรติอมรรัชช์ : การพัฒนาเทคนิคอัลลีลสเปซิฟิกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ดอทบลอต  
สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย (Development  
Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot Technique to Detect Common *G6PD*  
Mutations in Thailand) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร  
, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.พิสิฐ ทรัพย์วิวัฒน์, 80 หน้า.

ภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G6PD) เป็นภาวะที่พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ปัจจุบันมีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* หลายวิธี เช่น PCR-RFLP, DNA sequencing แต่ละวิธีมีข้อจำกัดหลายด้าน อาทิเช่น ใช้เวลาในการตรวจสอบนานและตรวจสอบได้ทีละหนึ่งชนิด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงพัฒนาเทคนิคอัลลีลสเปซิฟิกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ดอทบลอต (ASO) เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ G6PD Mahidol (487G>A), G6PD Viangchan (871G>A), G6PD Canton (1376G>T) และ G6PD Kaiping (1388G>A) โดยออกแบบ mutant probe และ normal probe สำหรับการกลายพันธุ์แต่ละชนิด และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธี PCR-RFLP และ sequencing จากผลการศึกษาในตัวอย่าง DNA 199 ราย พบว่า probe ชนิด Canton mutant และ Kaiping mutant สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton และ G6PD Kaiping ตามลำดับ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่า sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) เป็นร้อยละ 100 ส่วน probe ชนิดอื่นๆ มีค่า sensitivity, specificity, PPV และ NPV ระหว่างร้อยละ 88.89-99.46 ยกเว้น Mahidol normal probe ที่มีค่า specificity ร้อยละ 50 และ Mahidol mutant probe ที่มีค่า sensitivity ร้อยละ 50 ด้วยเหตุนี้จึงมีเพียง probe ชนิด Canton mutant และ Kaiping mutant ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจการกลายพันธุ์แบบ reverse dot blot (RDB) ได้ในอนาคต แม้เทคนิค ASO ที่ได้รับการพัฒนาในครั้งนี้จะเป็นวิธีที่ง่ายและให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วภายในเวลา 6 ชั่วโมง และสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้พร้อมกันมากกว่าหนึ่งชนิด แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านความถูกต้องของ probe ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์บางชนิดและการตรวจพร้อมกันทุกชนิดการกลายพันธุ์

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5574207730 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: ALLELE SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE DOT BLOT, G6PD MUTATION, THAILAND

PATCHARAKORN KIAT-AMORNRAK: Development Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot Technique to Detect Common *G6PD* Mutations in Thailand. ADVISOR: CHALISA LOUICHAROEN CHEEPSUNTHORN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. PHISIT PRAPUNWATTANA, Ph.D., 80 pp.

Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is the most common enzyme deficiency in the world, especially in Southeast Asia including Thailand. G6PD deficiency is caused by *G6PD* gene mutation. There are several methods such as polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing, currently used for *G6PD* mutation detection. These techniques have limitations such as time consuming and unable to detect several mutations simultaneously. In this study, we have developed an allele specific oligonucleotide (ASO) dot blot technique to detect common *G6PD* mutations in Thailand including G6PD Mahidol (487G>A), G6PD Viangchan (871G>A), G6PD Canton (1376G>T) and G6PD Kaiping (1388G>A). Mutant and normal probes for each mutation were designed to detect these mutations in 199 DNA samples. The results of ASO were compared with of PCR-RFLP and sequencing. The results indicated that sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of Canton and Kaiping mutant probes were 100%, whereas these values of other probes except Mahidol mutant and normal probes were between 88.89-99.46%. Specificity of Mahidol normal probe and sensitivity of Mahidol mutant probe was 50%. Thus, only Canton and Kaiping mutant probes could be further developed for G6PD mutations detection kit as reverse dot blot (RDB). Although ASO is an easy and rapid technique, which is able to detect several *G6PD* mutations simultaneously within 6 hours, there are some limitations in term of accurate detection of probes in some mutations and simultaneously detect all common mutations.

Department: Biochemistry

Student's Signature .....

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2016

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ในการดำเนินการวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงสมบูรณ์ ข้าพเจ้าได้รับความอนุเคราะห์ ความเมตตาและความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากบุคคลหลายท่าน จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ชาลิสา หลุยเจริญ ชิพสุนทร ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ซึ่งได้กรุณาให้ความช่วยเหลือในการให้คำปรึกษาการวิจัย และคำแนะนำตลอดจนการตรวจทานแก้ไขงานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐภัฏ ประพันธ์วัฒนะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำต่างๆในด้านการเรียนและการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อิศรางค์ นุชประยูร และ อ.ดร. อาคม ไสงาม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำและข้อคิดต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ ศาตราจารย์แพทย์หญิง ศรีวิชา ครุฑสุตร หัวหน้าภาควิชาสุขวิทยาเขตร้อนโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ แนวคิด และมุมมองต่างๆให้แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนในครอบครัว ที่คอยสนับสนุนทุนการศึกษาคอยอยู่เคียงข้าง และคอยให้คำปรึกษาและกำลังใจกับข้าพเจ้ามาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่น้องสมาชิกห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ 828 ชั้น 8 อาคารแพทยพัฒน์ทุกท่านสำหรับการช่วยเหลือและสนับสนุน คอยให้คำปรึกษา และกำลังใจที่ดีเสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 23 ครั้งที่ 1/2557 จึงขอแสดงความขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	3
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คำถามของงานวิจัย .....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.4 สมมติฐาน .....	2
1.5 คำสำคัญ.....	3
1.6 รูปแบบการวิจัย .....	3
1.7 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	3
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.9 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย .....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.2 ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD .....	6
2.2.1 อาการแสดงทางคลินิก.....	7
2.2.1.1 ภาวะตัวเหลืองในเด็กทารก .....	7
2.2.1.2 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากกินถั่วปากอ้า.....	7
2.2.1.3 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการบริโภคยาบางชนิด .....	8

2.2.1.4	ภาวะโลหิตจางที่เกิดจากการติดเชื้อ .....	8
2.2.2	ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	8
2.3	อณูพันธุศาสตร์ของยีน <i>G6PD</i> .....	10
2.3.1	รูปแบบการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ของยีน <i>G6PD</i> .....	11
2.4	การตรวจสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD .....	13
2.4.3	Methemoglobin reduction test (MRT) (45) .....	13
2.4.4	การทดสอบปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ (Cytochemical assay).....	14
2.5	เทคนิคการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> .....	14
2.5.1	PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism .....	14
2.5.2	Allele Specific-PCR (AS-PCR) .....	14
2.5.3	Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot (ASO) .....	15
2.5.4	Reverse Dot Blot Hybridization (RDB) .....	15
2.5.5	DNA sequencing .....	15
บทที่ 3	.....	17
วิธีดำเนินการวิจัย	.....	17
3.1	ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย .....	17
3.2	การยืนยันการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Direct sequencing (Sanger's method).....	17
3.2.1	การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	17
3.2.2	Gel Electrophoresis .....	19
3.2.3	การทำ DNA ให้บริสุทธิ์ (DNA purification).....	19
3.2.3.1	ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation) .....	19
3.2.3.2	การจับของ DNA (DNA binding).....	20



3.2.3.3 การล้าง (Wash).....	20
3.2.3.4 การละลาย DNA (DNA Elution).....	20
3.2.4 วัดความเข้มข้นของ PCR product .....	20
3.2.5 การอ่านผลลำดับเบส.....	20
3.3 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี ASO.....	20
3.3.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	20
3.3.2 Gel Electrophoresis .....	22
3.3.3 Hybridization .....	23
3.3.3.1 ขั้นตอนการเตรียม membrane (.....	23
3.3.3.2 ขั้นตอนการตรึง DNA บนเมมเบรน.....	24
3.3.3.3 ขั้นตอนการเตรียม probe.....	24
3.3.3.4 ขั้นตอนการ Hybridization.....	25
3.3.3.5 ขั้นตอนการทำให้เกิดสี.....	25
3.3.4.1 การวิเคราะห์ผล DNA Sequencing.....	25
3.3.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลผลการทำ ASO.....	25
บทที่ 4 .....	27
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	27
4.1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ศึกษา.....	27
4.2 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ด้วยวิธี direct sequencing & PCR-RFLP .....	27
4.3.1 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (single-tube multiplex-PCR).....	32
4.3.2 ปัจจัยที่มีต่อการ hybridization .....	33
4.3.2.1 อุณหภูมิ.....	33

4.3.2.2 ความเข้มข้นของเกลือใน buffer (Saline-Sodium-Phosphate-EDTA หรือ SSPE).....	36
4.3.2.3 ปริมาณของ probe ที่ใช้ในการ hybridization .....	37
4.3.2.4 ปริมาณของ PCR product ที่ต้องการตรวจสอบ .....	38
4.3.4 ประสิทธิภาพของวิธี ASO.....	55
4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis).....	55
บทที่ 5 .....	59
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	59
5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการ hybridization.....	60
5.1.1 อุณหภูมิในการ hybridization.....	60
5.1.2 ปริมาณของ probe .....	60
5.1.3 ปริมาณของ target DNA .....	61
5.1.4 ความเข้มข้นของเกลือใน buffer (saline-sodium phosphate-EDTA หรือ SSPE).....	61
5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลจากการคำนวณค่า sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) .....	62
5.3 ข้อจำกัดและแนวทางแก้ไขของการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>G6PD</i> ด้วยวิธี ASO.....	62
5.3.1 ความสามารถในการตรวจสอบได้พร้อมกัน .....	62
5.3.3 ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ .....	64
รายการอ้างอิง .....	65
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	80

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดงประเภทของความผันแปรของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	6
ตารางที่ 2	แสดงยาและสารเคมีที่ทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD.....	8
ตารางที่ 3	แสดงชนิดการกลายพันธุ์และความสัมพันธ์ทางเชื้อชาติ.....	12
ตารางที่ 4	ลำดับเบสของ primer และขนาด PCR product สำหรับตรวจสอบการกลายพันธุ์ ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Direct sequencing.....	18
ตารางที่ 5	ลำดับ nucleotide ของ primer และขนาดผลิตภัณฑ์ของแต่ละ exon.....	21
ตารางที่ 6	ลำดับ nucleotide ของ mutagenic primer ที่ออกแบบให้มีตำแหน่งของการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ และขนาดผลิตภัณฑ์ของแต่ละ exon.....	22
ตารางที่ 7	ส่วนผสมของ polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8.....	23
ตารางที่ 8	ลำดับ nucleotide ของ normal probe และ mutation probe.....	24
ตารางที่ 9	ตารางคำนวณค่า Sensitivity, Specificity, Positive predictive value และ.....	26
ตารางที่ 10	แสดงอุณหภูมิของ probe ที่เหมาะสมต่อชนิดการกลายพันธุ์.....	36
ตารางที่ 11	แสดงสรุปตัวอย่างผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน G6PD กับ probe ชนิดต่างๆ....	48
ตารางที่ 12	แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบหาการกลายพันธุ์ระหว่างวิธี PCR-RFLP กับวิธี ASO.....	54
ตารางที่ 13	แสดงประสิทธิภาพการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของวิธี ASO.....	55
ตารางที่ 14	แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Mahidol Mutant probe.....	55
ตารางที่ 15	แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Mahidol Normal probe.....	56
ตารางที่ 16	แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Viangchan Mutant probe.....	56

<b>ตารางที่ 17</b> แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Viangchan Normal probe .....	56
<b>ตารางที่ 18</b> แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Canton Mutant probe .....	57
<b>ตารางที่ 19</b> แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Canton Normal probe .....	57
<b>ตารางที่ 20</b> แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Kaiping Mutant probe .....	57
<b>ตารางที่ 21</b> แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Kaiping Normal probe .....	58



## สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงวิถีเพนโทสฟอสเฟต .....	5
รูปที่ 2 แสดงปฏิกิริยารีดอกซ์ของกลูตาไธโอน (Glutathione redox) .....	6
รูปที่ 3 แสดงความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (32).....	10
รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของยีน G6PD บนโครโมโซม Xq28 (1).....	11
รูปที่ 5 แสดงโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ G 6-PD โดยแสดงบริเวณเร่งและตำแหน่งที่จับกับ โมเลกุลของ NADP (36).....	11
รูปที่ 6 ตำแหน่งของ primer บนยีน G6PD.....	19
รูปที่ 7 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศชาย (GD008) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol (487G>A) ด้วยวิธี RFLP .....	27
รูปที่ 8 แสดงผล PCR-RFLP จากการทำ 8% polyacrylamide gel electrophoresis ของการ กลายพันธุ์ชนิด Mahidol .....	28
รูปที่ 9 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศชาย (H49) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan (871G>A) ด้วยวิธี RFLP .....	28
รูปที่ 10 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศหญิง (H27) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan (871G>A) ด้วยวิธี RFLP .....	29
รูปที่ 11 แสดงผล PCR-RFLP จากการทำ 8% polyacrylamide gel electrophoresis ของ การกลายพันธุ์ชนิด Viangchan .....	29
รูปที่ 12 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศชาย (S181) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton (1376G>T) ด้วยวิธี RFLP.....	30
รูปที่ 13 แสดงผล PCR-RFLP จากการทำ 8% polyacrylamide gel electrophoresis ของ การกลายพันธุ์ชนิด Canton.....	30
รูปที่ 14 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศชาย (GD274) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping (1388G>A) ด้วยวิธี RFLP.....	31
รูปที่ 15 แสดงผล PCR-RFLP จากการทำ 8% polyacrylamide gel electrophoresis ของ การกลายพันธุ์ชนิด Kaiping.....	31

รูปที่ 16 แสดงผลการตรวจสอบความเข้มข้นของ PCR product เทียบกับ marker ด้วย 1% agarosse gel electrophoresis .....	32
รูปที่ 17 แสดงผลการทำ ASO ของ G6PD Mahidol .....	33
รูปที่ 18 แสดงผลการทำ ASO ของ G6PD Viangchan .....	34
รูปที่ 19 แสดงผลการทำ ASO ของ G6PD Canton.....	35
รูปที่ 20 แสดงผลการทำ ASO ของ G6PD Kaiping.....	36
รูปที่ 21 แสดงผลการทำ ASO ของ mutant probe Mahidol ที่เจือจางความเข้มข้นของเกลือ ..	37
รูปที่ 22 แสดงผลการทำ ASO ของ mutant probe Kaiping.....	38
รูปที่ 23 แสดงผลการทำ ASO โดยเจือจาง PCR product ให้มีปริมาณ PCR product ตั้งแต่ 25 ng ถึง 370 ng.....	38
รูปที่ 24 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol ด้วยวิธี ASO.....	39
รูปที่ 25 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan ด้วยวิธี ASO .....	39
รูปที่ 26 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan ด้วยวิธี ASO .....	40
รูปที่ 27 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton ด้วยวิธี ASO .....	40
รูปที่ 28 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton ด้วยวิธี ASO .....	41
รูปที่ 29 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping ด้วยวิธี ASO.....	41
รูปที่ 30 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping ด้วยวิธี ASO.....	42
รูปที่ 31 แสดงตัวอย่างผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน G6PD กับ probe ชนิดต่างๆ.....	47

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose 6-phosphate dehydrogenase; G 6-PD) มีบทบาทสำคัญในการสร้างนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH) ที่ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ช่วยกำจัดสารอนุมูลอิสระของเซลล์ในปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) ของกลูตาไธโอน (glutathione) (1) เอนไซม์ G 6-PD จึงเป็นเอนไซม์สำคัญในการป้องกันเม็ดเลือดแดงจากพิษของออกซิเจน ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ทำให้เอนไซม์ G 6-PD ทำงานลดลง (2) เป็นผลให้ไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ได้ จึงเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* บนโครโมโซม X ตำแหน่ง q28 ที่ถ่ายทอดแบบ X-linked recessive (3) ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD สามารถพบได้ทั่วโลกหรือมากกว่า 400 ล้านคน (4, 5) โดยเฉพาะภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยมีการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบบ่อย คือ G6PD Viangchan (871 G>A : Val 291 Met), G6PD Mahidol (c.487 G>A), G6PD Kaiping (c.1388 G>A) และ G6PD Canton (c.1376 G>A) (6)

ปัจจุบันการตรวจกัมมันตภาพของเอนไซม์หรือตรวจสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD มีหลายวิธี อาทิเช่น spectrophotometric assay (7) fluorescent spot test (8) และ methemoglobin reduction test (MRT) (9) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การตรวจกัมมันตภาพของเอนไซม์ยังมีข้อจำกัดในการคัดกรองผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่มีรูปแบบพันธุกรรม (genotype) ของยีน *G6PD* แบบแฝง (heterozygote) หรือกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกมาก (hemolytic anemia) ร่างกายจึงสร้างเม็ดเลือดแดงขึ้นทดแทน จึงทำให้มีปริมาณ reticulocyte ในเลือดสูงกว่าปกติ มีผลให้ค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ใกล้เคียงกับคนปกติ เป็นเหตุให้การแปลผลผิดพลาด (false negative) ดังนั้นการตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในกลุ่มประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่พบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ปริมาณสูง (10) ด้วยการตรวจเฉพาะค่ากัมมันตภาพเอนไซม์เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ จึงควรตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ร่วมด้วย เพื่อยืนยันผลการตรวจทั้งในระดับโปรตีนและพันธุกรรม

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* มีหลายวิธี อาทิเช่น polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) (11) allele specific-PCR (AS-PCR) (12) และการตรวจลำดับเบสของ DNA (DNA sequencing) (13) เป็นต้น แต่การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ด้วยวิธีดังที่กล่าวไปแล้วนั้นมีข้อจำกัดมากมาย เช่น วิธี PCR-RFLP คือ

เทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) มาตัดสาย DNA ที่ต้องการตรวจสอบ ณ ตำแหน่งที่จำเพาะ โดยสามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ครั้งละหนึ่งชนิดเท่านั้น ดังนั้นในกรณีที่มีการกลายพันธุ์หลายชนิดที่พบได้บ่อยๆ ในกลุ่มประชากรนั้น จึงต้องทำการทดสอบหลายครั้ง ทำให้ใช้เวลานาน ส่วนการตรวจด้วยวิธี AS-PCR มีความยุ่งยากในการออกแบบไพรเมอร์ (primer) ให้มีความจำเพาะกับชนิดของการกลายพันธุ์และต้องใช้ primer 2 คู่ในการตรวจการกลายพันธุ์เพียงชนิดเดียว อีกทั้งต้องทดสอบหลายครั้งหากต้องการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิดอื่นๆ ส่งผลให้การตรวจชนิดการกลายพันธุ์เป็นไปอย่างล่าช้าและสิ้นเปลืองเช่นกัน ส่วน DNA sequencing เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง ด้วยยีน *G6PD* มีขนาดประมาณ 18 กิโลเบส (kilobase; Kbp) โดยมีบริเวณที่ถูกถอดรหัส (coding region) ทั้งหมด 12 บริเวณซึ่งถูกคั่นด้วยอินทรอน (intron) ขนาดใหญ่ จึงต้องแยกตรวจลำดับเบสเป็น 12 บริเวณ ทำให้เพิ่มค่าตรวจลำดับเบสเป็นทวีคูณ ด้วยเหตุนี้การพัฒนาวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่สามารถตรวจชนิดของการกลายพันธุ์ได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการระบุรูปแบบการกลายพันธุ์ของผู้ป่วยและช่วยยืนยันผลการตรวจสอบภาวะพร่องเอนไซม์ของผู้ป่วย

ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าพัฒนาเทคนิคอัลลีลสเปซิฟิกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ดอทบล็อต (allele specific oligonucleotide dot blot) (14) เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย เพราะเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ จำเพาะสูง และสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้หลายชนิดพร้อมๆ กัน

## 1.2 คำถามของงานวิจัย

เทคนิค allele specific oligonucleotide dot blot สามารถนำมาพัฒนาตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทยได้หรือไม่

## 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย ด้วยเทคนิค allele specific oligonucleotide dot blot

## 1.4 สมมติฐาน

เทคนิค allele specific oligonucleotide dot blot เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบบ่อยในประเทศไทยได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยมีค่า sensitivity และ specificity สูง (ร้อยละ 100) และสามารถตรวจสอบชนิดของการกลายพันธุ์ได้หลายๆ ชนิดพร้อมกัน



### 1.5 คำสำคัญ

อัลลีลสเปซิฟิกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ดอทบロット (Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot)

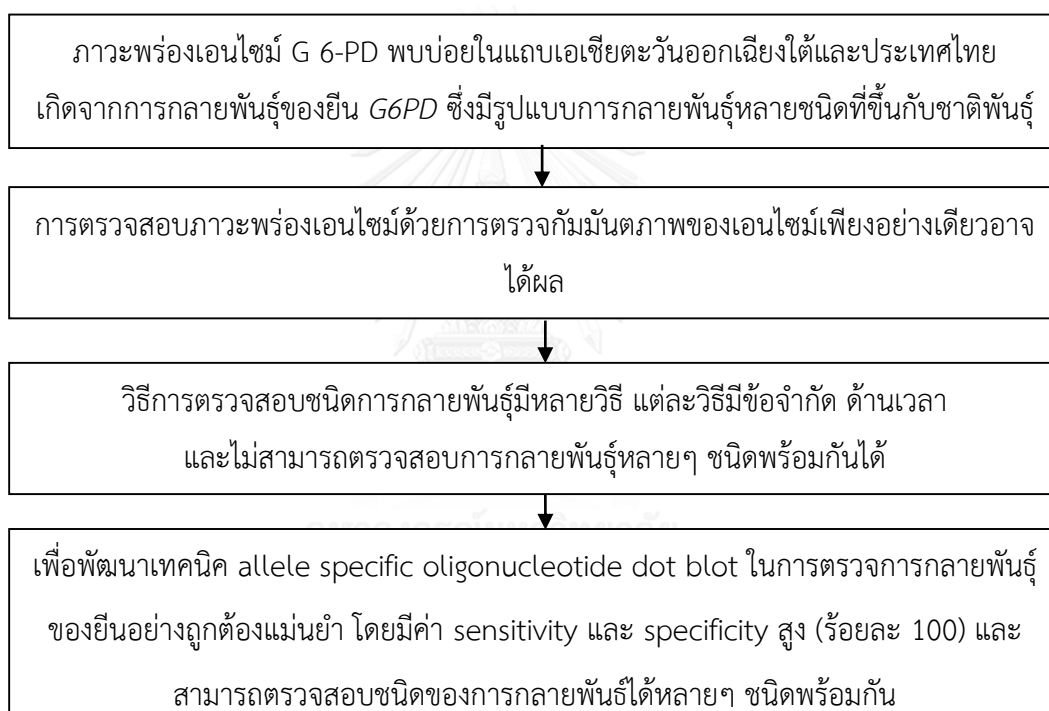
การกลายพันธุ์ของยีนจีซีจีพีดี (*G6PD* Mutations)

ประเทศไทย (Thailand)

### 1.6 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research)

### 1.7 กรอบแนวคิดในการวิจัย



### 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทยด้วยวิธี allele specific oligonucleotide dot blot ซึ่งสามารถตรวจการกลายพันธุ์หลายชนิดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยมีค่า sensitivity และ specificity สูง (ร้อยละ 100) และสามารถตรวจสอบชนิดของการกลายพันธุ์ได้หลายๆ ชนิดพร้อมกัน เพื่อนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลสำหรับตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยและเพื่อการวิจัยต่อไป

### 1.9 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

เทคนิค allele specific oligonucleotide dot blot คือ การตรึง DNA เป้าหมาย (target DNA) บนเมมเบรน (membrane) แล้วนำโพรบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) มาไฮบริดไดซ์ (hybridize) และตรวจสอบสัญญาณปฏิกิริยาการเกิดสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ที่ติดฉลากด้วยสเตรปตาวิดิน (streptavidin) ซึ่งจับจำเพาะกับ biotin ทั้งนี้ประโยชน์ของเทคนิค allele specific oligonucleotide dot blot คือสามารถวินิจฉัยการกลายพันธุ์ได้ (15)



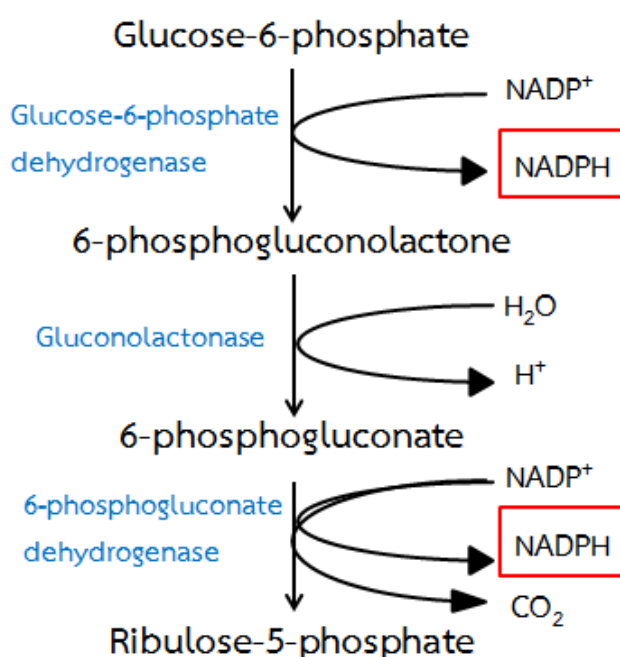
## บทที่ 2

## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

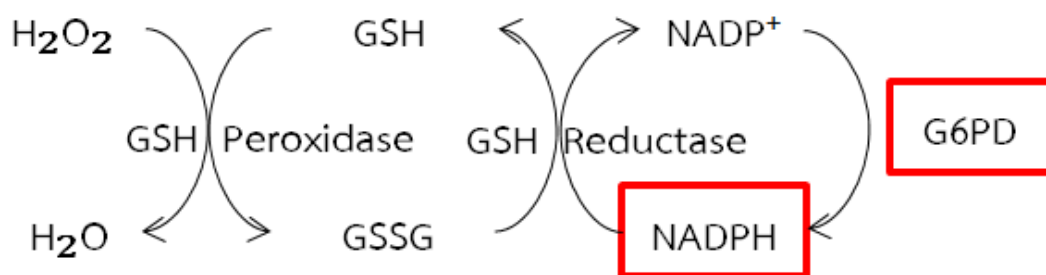
## 2.1 เอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส

G 6-PD เป็นเอนไซม์ในวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway: PPP) มีหน้าที่สร้างนิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH จากนิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) (รูปที่ 1) ที่มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (16) โดย NADPH เป็นโคเอนไซม์ของ กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase; GSSG-RX) ในการเปลี่ยนออกซิไดซ์กลูตาไธโอน (oxidized glutathione; GSSG) ให้เป็นรีดิวซ์กลูตาไธโอน (reduced glutathione; GSH) ดังแสดงในรูปที่ 2 เอนไซม์ G 6-PD มีความสำคัญมากสำหรับเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่มีนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย จึงไม่สามารถอาศัยวิถีเมแทบอลิซึมอื่นๆ ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นเมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จึงทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียดและแตก ส่งผลให้เกิดภาวะโลหิตจางจากเซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (acute hemolytic anemia) (17)

### Pentose Phosphate Pathway (PPP)



รูปที่ 1 แสดงวิถีเพนโทสฟอสเฟต



รูปที่ 2 แสดงปฏิกิริยารีดอกซ์ของกลูตาไธโอน (Glutathione redox)

## 2.2 ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน  $G6PD$  บนโครโมโซมเพศ X (X-chromosome) (3) ทำให้เอนไซม์ G 6-PD ทำงานลดลง (2) เมื่อผู้ป่วยได้รับสารกระตุ้น oxidation จะเกิดการ oxidize ส่วนของ sulfhydryl group ของ hemoglobin ทำให้เกิดเมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) และตกตะกอนเป็นก้อนที่ผนังเซลล์มากขึ้น เรียกว่า heinz body ซึ่งเป็นสาเหตุของ hemolysis (18) ทั้งนี้ในภาวะปกติ เซลล์จะมีกระบวนการกำจัด methemoglobin ผ่าน hexose monophosphate shunt (HMP) ลด methemoglobin โดยอาศัยเอนไซม์ NADH methemoglobin reductase ในการเปลี่ยน ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) กลับเป็น ferrous iron ( $\text{Fe}^{2+}$ )

ในปี ค.ศ. 1989 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้แบ่งกลุ่มของความผันแปรของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ออกเป็น 5 ประเภท ตามค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ และอาการทางคลินิก (16) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงประเภทของความผันแปรของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

ประเภท	ค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์	อาการทางคลินิก
1	พร่องเอนไซม์อย่างรุนแรง	ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเรื้อรัง (Chronic non-spherocytic hemolytic anemia)
2	พร่องเอนไซม์อย่างรุนแรง (ร้อยละ 1-10)	ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน
3	พร่องเอนไซม์ปานกลาง (ร้อยละ 10-60)	ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันชั่วคราว
4	กัมมันตภาพของเอนไซม์อยู่ระหว่างร้อยละ 60-100	ไม่แสดงอาการของโรค
5	กัมมันตภาพของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (มากกว่าร้อยละ 150)	ไม่แสดงอาการของโรค

### 2.2.1 อาการแสดงทางคลินิก

ในภาวะปกติผู้ป่วยมักไม่มีอาการทางคลินิก แต่เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นต่างๆ เช่น การติดเชื้อมีไข้สูง การกินถั่วปากอ้า (fava beans หรือ broad beans) หรือได้รับยาบางชนิด ทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการต่างๆ เช่น ภาวะซีดจากเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (acute hemolytic anemia) เหนื่อยง่าย อ่อนเพลีย ตาหรือตัวเหลือง ปัสสาวะมีสีคล้ำ ปริมาณปัสสาวะอาจน้อยจนอาจนำไปสู่ภาวะไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) นอกจากนี้ยังส่งผลให้การควบคุมสมดุลของสารเกลือแร่ต่างๆ ของร่างกายเสียไป (19) ทั้งนี้สิ่งกระตุ้นที่แตกต่างกันย่อมมีผลต่อระดับความรุนแรงที่ต่างกันของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยสามารถจำแนกอาการทางคลินิกได้ดังนี้

#### 2.2.1.1 ภาวะตัวเหลืองในเด็กทารก

ภาวะตัวเหลืองในเด็กทารก (neonatal jaundice : NNJ) เนื่องจากมีปริมาณของบิลิรูบิน (bilirubin) มากกว่าปกติประมาณ 6-7 มิลลิกรัม/เดซิลิตร โดยระดับสูงสุดไม่ควรเกิน 13 มิลลิกรัม/เดซิลิตร โดยสารบิลิรูบิน (สารสีเหลือง) เกิดจากการที่เอนไซม์ฮีโมออกซิจีเนส (heme oxygenase) ที่ม้ามเปลี่ยนฮีโม (heme) ในเม็ดเลือดแดงให้เป็นบิลิเวอร์ดีน (biliverdin) ซึ่งต่อมาจะถูกเปลี่ยนเป็นบิลิรูบิน โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นเมื่อร่างกายต้องการทำลายเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุขัยหรือเมื่อเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตก โดยปกติบิลิรูบินจะถูกนำเข้าสู่ตับ และมีการเปลี่ยนจากสารที่ไม่ละลายน้ำเป็นสารที่ละลายน้ำได้ โดยเอนไซม์ bilirubin glucuronyl transferase แล้วขับออกจากร่างกายผ่านไปในทางเดินน้ำดี เข้าสู่ลำไส้ และขับออกทางอุจจาระในรูปของ stercobilin ส่วนหนึ่งซึ่งเป็นส่วนน้อย ถูกดูดซึมจากลำไส้กลับเข้าสู่กระแสเลือด และขับออกทางปัสสาวะในรูปของ urobilin (20) ในเด็กคลอดครบกำหนดสามารถพบภาวะตัวเหลืองในเด็กทารกได้ประมาณร้อยละ 25-50 โดยปริมาณบิลิรูบินที่มากกว่าปกติมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ UDP-glucuronyl transferase ในเด็กแรกเกิดยังไม่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถขับออกจากร่างกายทางอุจจาระและปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ

#### 2.2.1.2 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากกินถั่วปากอ้า

ถั่วปากอ้า มีสารวิซิน (vicine) และคอนวิซิน (convicine) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารเหล่านี้ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคไซด์ (glucoside) เชื่อมกับวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีชื่อว่า ไดวิซิน (divicine) และไอโซยูรามิล (isouramil) โดยการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) ซึ่งมีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์กลูตาไธโอน (1, 7) ดังนั้นผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD เมื่อบริโภคถั่วปากอ้าเข้าไปจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (favism) และทำให้ปัสสาวะมีสีคล้ำจากฮีโมโกลบิน (hemoglobinuria) (21)

### 2.2.1.3 ภาวะโลหิตจางเฉียบพลันจากการบริโภคยาบางชนิด

ยาบางชนิด (ตารางที่ 2) กระตุ้นภาวะเครียดของเซลล์ เช่นยา dapsone ที่ทำลายเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ ยา primaquine ที่ทำลายเชื้อ *P. vivax* และ *P. ovale* ในระยะ hypnozoite ซึ่งมีฤทธิ์ชักนำให้เกิดภาวะโลหิตจางเฉียบพลันในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD ดังนั้นการรักษามาลาเรียจึงจำเป็นต้องตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เพื่อป้องกันผลข้างเคียงของยา (16)

**ตารางที่ 2** แสดงยาและสารเคมีที่ทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในผู้ป่วยภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

Acetanilide	Isobutyl nitrite	Phenazopyridine	Sulfanilamide
Chloramphenicol	Methylene blue	Phenylhydrazine	Sulfapyridine
Ciprofloxacin	Naphtalene	Primaquine	Sulfasalazine
Dapsone	Nalidixic acid	Quinacrine	Thiazolesulfon
Doxorubicin	Niridazole	Sulfacetamide	Trinitrotoluene
Furuzolidone	Nitrofurantoin	Sulfadimidine	Urate oxidase
Gilbenclamide	Pamaquine	Sulfamethoxazole	

### 2.2.1.4 ภาวะโลหิตจางที่เกิดจากการติดเชื้อ

การติดเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางเฉียบพลันในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G 6-PD (7) เนื่องจากการติดเชื้อจะมีการรวมตัวของเม็ดเลือดขาวเพื่อทำลายเชื้อโรค ซึ่งเม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะปล่อยสารอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) หรือ ไนตริกออกไซด์ (NO) เพื่อทำลายเชื้อโรค ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงแตก (21) ตัวอย่างเชื้อที่ก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางเฉียบพลัน อาทิเช่น ไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอ และ บี (hepatitis viruses A, B) การติดเชื้อไซโตเมกะโลไวรัส (cytomegalovirus: CMV) โรคปอดอักเสบ (pneumonia) และไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) เป็นต้น

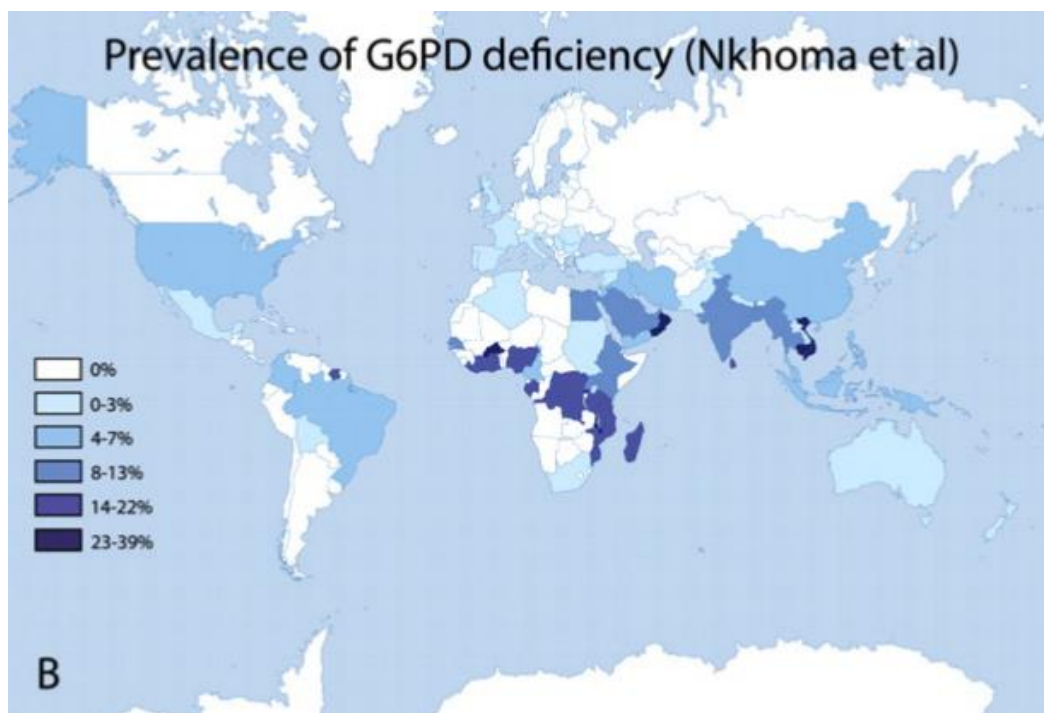
## 2.2.2 ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

ปัจจุบันพบผู้ป่วยพร่องเอนไซม์ G 6-PD ประมาณ 400 ล้านคนทั่วโลก (22) ซึ่งพบมากในทวีปแอฟริกา ยุโรปใต้ หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก เอเชียกลาง และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และยุโรปเหนือ (23) เนื่องจากมีการอพยพย้ายถิ่นของประชากรไปสู่ทวีปเหล่านั้น ดังรูปที่ 3 ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประกอบไปด้วยประชากรหลากหลายเชื้อชาติอาศัยอยู่ โดยแต่ละเชื้อชาติจะมีความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD สูง อีกทั้งภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ยังพบรายงานการระบาดของมาลาเรียตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ซึ่งพื้นที่ที่มีการระบาดของมาลาเรียนั้นจะมีความสัมพันธ์กับความชุกของภาวะพร่อง

เอนไซม์ G 6-PD (ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จะเพิ่มขึ้นถ้าอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มี มาลาเรียชุกชุม) โดยพบภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในชาวเขมรเพศชายร้อยละ 12.6-26.1 เพศหญิง ร้อยละ 3.1 (24) ชาวพม่าเพศชายร้อยละ 7.3-11 (3, 25), ชาวกะเหรี่ยงร้อยละ 24 (26) ชาวมอญ เพศชายร้อยละ 6.7-12 (3) ชาวมาเลย์เพศชายร้อยละ 4.6 และเพศหญิงร้อยละ 1.3 (27) ชาวลาว เพศชายร้อยละ 7.2 ชาวไทยใหญ่ในรัฐฉาน (Shan) ร้อยละ 10.8 ดานู (Danu) ร้อยละ 7.1 คะฉิ่น (Kachin) ร้อยละ 3 อะบอริจิน (Amboiness) ร้อยละ 6 และลิสู (Lisu) ร้อยละ 2.6 (28) ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD จากเด็กแรกเกิดทั้งหมด 522 คน พบว่ามีความ ชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ในเพศชายร้อยละ 11.1 (350 คน) และในเพศหญิงร้อยละ 5.8 (172 คน) (29)

ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ส่วนใหญ่พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง เนื่องมาจากภาวะ พร่องเอนไซม์ G 6-PD มีการถ่ายทอดแบบ X-linked recessive และผู้ชายมีโครโมโซมเพศ X เพียง แท่งเดียว เรียกว่า hemizygote เมื่อมีการกลายพันธุ์บนโครโมโซมเพศ X จึงแสดงภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ได้ชัดเจนกว่าผู้หญิงที่มีโครโมโซมเพศ X 2 แท่ง จึงมีลักษณะทางพันธุกรรมได้ 3 ลักษณะ คือ

1. homozygous wild type หรือไม่พบการกลายพันธุ์
2. homozygous mutant หรือพบการกลายพันธุ์ทั้งสองโครโมโซมเพศ X ทำให้ผู้ป่วยมีกัม มันตภาพเอนไซม์ต่ำอย่างชัดเจน
3. heterozygous mutant ซึ่งโครโมโซมมีการกลายพันธุ์เพียงโครโมโซมเดียว ดังนั้นจึงมี การแสดงออกทั้งยีนปกติและผิดปกติจากปรากฏการณ์ X-inactivation ซึ่งระดับของการแสดงจะ ขึ้นอยู่กับกระบวนการ lyonization ทำให้ระดับกัมมันตภาพของเอนไซม์ขึ้นมีลักษณะ mosaicism (1, 30, 31)

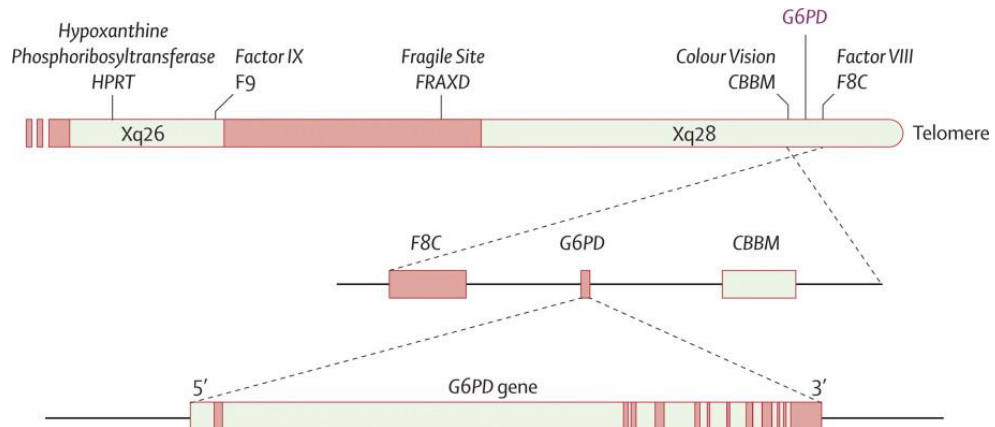


รูปที่ 3 แสดงความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD (32)

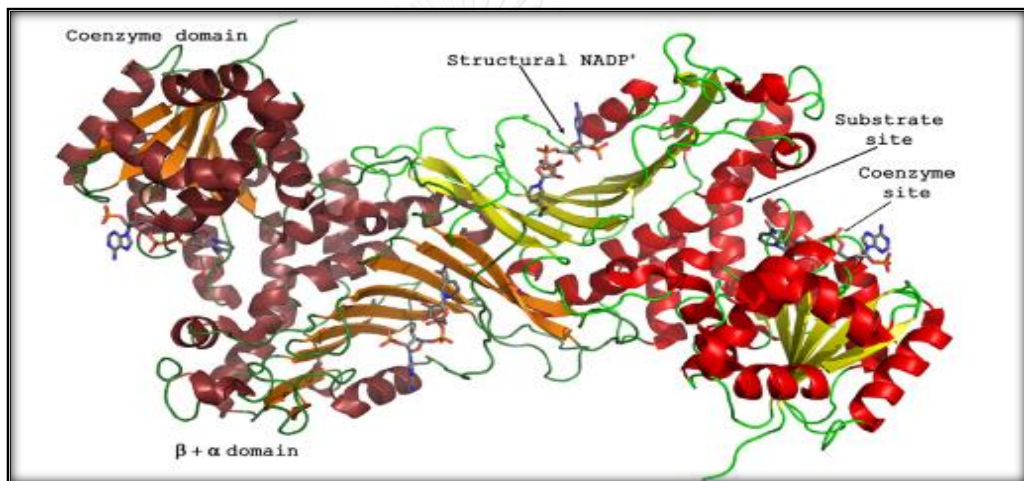
### 2.3 อณูพันธุศาสตร์ของยีน *G6PD*

ยีน *G6PD* อยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมเพศ X ตำแหน่ง Xq28 มีขนาด 18 Kbp ประกอบด้วย 13 เอกซอน (exon) และ 12 อินทรอน (intron) (16) (รูปที่ 4) (1) แพลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 514 กรดอะมิโน เอนไซม์ G 6-PD จะทำงานได้เมื่ออยู่ในรูปไดเมอร์ (dimer) หรือเตตราเมอร์ (tetramer) ในการทำ multiple sequence alignment ของยีน *G6PD* ในมนุษย์และ *Leuconostoc mesenteroides G6PD* (LM *G6PD*) พบว่า บริเวณที่เป็น Coenzyme site ( $\text{NADP}^+$ ) จะอยู่ในส่วนของ N-terminal domain ในตำแหน่งของกรดอะมิโนลำดับที่ 38-44 มีลำดับ GXXGDLA และบริเวณที่เป็น G 6-P binding site อีก 9 กรดอะมิโนจะอยู่ในส่วนของ  $\beta$ - $\alpha$  domain ในตำแหน่งของกรดอะมิโนลำดับที่ 198-205 มีลำดับ RIDHYLGKE (33, 34) โดยกรดอะมิโน Aspartate, lysine และ histidine เป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญสำหรับบริเวณ G 6-P binding site และ catalysis ใน LM *G6PD* (35) (รูปที่ 5) (36)





รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของยีน G6PD บนโครโมโซม Xq28 (1)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ G 6-PD โดยแสดงบริเวณเร่งและตำแหน่งที่จับกับโมเลกุลของ NADP (36)

### 2.3.1 รูปแบบการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ของยีน G6PD

การกลายพันธุ์ของยีน G6PD มีความหลากหลายที่แตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ (ตารางที่ 3) ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิด Mahidol และ Viangchan ได้บ่อยที่สุด โดยการกลายพันธุ์ชนิด Mahidol มักจะกระจายตัวอยู่ในกลุ่มชาติพันธุ์ พม่า ร้อยละ 96.20 (25/26) (37) มอญ ร้อยละ 63 (12/19) (3) กระเหรี่ยง ร้อยละ 65.3 ( 17/26) (6) การกลายพันธุ์ชนิด Viangchan จะพบในกลุ่มชาติพันธุ์เขมร ร้อยละ 97.90 (46/47) (6, 24, 38) ลาว ร้อยละ 72.70 (24/33) (28) ไทย ร้อยละ 53.80 (21/39) (29) และมาเลย์ ร้อยละ 37.20 (32/86) (27) นอกจากนี้ การกลายพันธุ์ชนิด Canton และ Kaiping ที่พบบ่อยในคนจีนสามารถพบได้ในชาวจีนโพ้นทะเลในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (39) เช่น ไทย ร้อยละ 9.50 (2/21) และ ร้อยละ 4.80 (1/21) (37) สิงคโปร์ มาเลย์ ร้อยละ 3.50 (3/86) และ ร้อยละ 2.30 (2/86) (27) ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงชนิดการกลายพันธุ์และความสัมพันธ์ทางเชื้อชาติ

ชนิดการกลายพันธุ์	ลำดับเบส	เบสที่เปลี่ยน	ลำดับกรดอะมิโน	เปลี่ยนจาก	เปลี่ยนเป็น	เชื้อชาติ
A	376	A → G	126	Asparagine	Aspartic acid	แอฟริกัน แอฟริกัน (40) แอฟริกัน
A <sup>-</sup>	376	A → G	126	Asparagine	Aspartic acid	
	202	G → A	68	Valine	Methionine	
Mediterranean	563	C → T	188	Serine	Phenylalanine	ยุโรป (41) มาเลเซีย
Coimbra	592	C → T	198	Arginine	Cysteine	(27)
Orissa	131	C → G	44	Alanine	Glycine	อินเดีย
Kerala-Kalyan	949	G → A	317	Glutamine	Lysine	(42, 43) อินเดีย
Canton	1,376	G → T	459	Arginine	Leucine	จีน (44)
Kaiping	1,388	G → A	463	Arginine	Histidine	เอเชีย
Gaohe	95	A → G	31	Histamine	Arginine	ตะวันออก
Chinese-3	493	A → G	165	Asparagine	Aspartic acid	เฉียงใต้ (45)
Chinese-4	392	G → T	131	Glycine	Valine	จีน, มาเลเซีย, สิงคโปร์ (40)
Chinese-5	1,024	C → T	342	Leucine	Phenylalanine	
Union	1360	C → T	454	Arginine	Histidine	
Viangchan	871	G → A	291	Valine	Methionine	ไทย (29) ลาว (28) เขมร (24)
Mahidol	487	A → G	163	Glycine	Serine	พม่า (37) มอญ (3)

## 2.4 การตรวจสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD

การตรวจสอบหาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

### 2.4.1 การตรวจวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ (39)

เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ตามที่องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดไว้เมื่อปี 1967 ซึ่งมีหลักการคือ เป็นการวิเคราะห์ปริมาณ NADPH จากการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (nanometer; nm) และนำค่าที่ได้มาคำนวณค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ G 6-PD โดยมีหน่วยเป็นหน่วยสากลต่อกรัมฮีโมโกลบิน (IU/g Hb) (46) ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ยังเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอยู่ (47) เนื่องจากสามารถระบุค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ได้แม่นยำ แต่มีข้อเสียคือ เป็นวิธีที่ยุ่งยากหลายขั้นตอน ใช้เวลานานหลายชั่วโมงและไม่เหมาะสำหรับการตรวจในประชากรที่มีจำนวนมาก อีกทั้งต้องใช้อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมในการทดสอบ นอกจากนี้ยังใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะที่เคลื่อนย้ายลำบาก ทำให้ไม่เหมาะต่อการออกภาคสนาม และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์

### 2.4.2 Fluorescent spot test (FST) (39, 48)

เป็นการทดสอบภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เชิงคุณภาพวิเคราะห์ โดยการนำตัวอย่างเลือดมาผสมกับ กลูโคส 6-ฟอสเฟตและ NADP และหยดบนกระดาษกรอง เป็นการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD โดยอาศัยคุณสมบัติ NADPH ในการเรืองแสงสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเหนือม่วงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร หากเรืองแสงแสดงว่าเอนไซม์ G 6-PD สามารถทำงานได้เป็นปกติ แต่หากไม่มีการเรืองแสงแสดงว่าตัวอย่างเลือดนั้นพร่องเอนไซม์ G 6-PD วิธีนี้สามารถจำแนกผู้ป่วยชายที่พร่องเอนไซม์ออกจากชายปกติได้ แต่ยังมีข้อเสียคือ ต้องการ UV lamp และ water bath ในการทดลอง ในส่วนของการจำแนกผู้ป่วยที่มีกัมมันตภาพเอนไซม์ปานกลาง เช่น กรณีที่ตัวอย่างเพศหญิงมีลักษณะ heterozygote จะมีการเรืองแสงเพียงเล็กน้อยหรือปกติ จะทำให้การตรวจไม่แม่นยำ (49)

### 2.4.3 Methemoglobin reduction test (MRT) (45)

เป็นวิธีการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ที่ได้รับความนิยมอีกวิธีหนึ่ง (50-52) โดยมีหลักการคือ ใส่สารไนเตรท (nitrite) ลงไปทำปฏิกิริยากับตัวอย่างเลือด เพื่อออกซิไดซ์ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ให้เป็นเมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) ซึ่งมีสีน้ำตาล จากนั้นใส่เมทิลีนบลู (methylene blue) ลงไปเพื่อทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เมทฮีโมโกลบิน หากตัวอย่างเลือดมี NADPH เมทิลีนบลูจะสามารถเร่งปฏิกิริยาให้เมทฮีโมโกลบิน (สีน้ำตาล) กลับมาเป็นฮีโมโกลบิน (ซึ่งมีสีแดง) ได้ มีข้อดีคือ เป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบได้ง่ายและประหยัด แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และบางครั้งยากต่อการอ่านผลระหว่างสีน้ำตาลและสีแดง

#### 2.4.4 การทดสอบปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ (Cytochemical assay) (39)

เป็นการตรวจเชิงปริมาณวิเคราะห์ที่ตรวจได้ทั้งกรณี hemizygous, homozygous และ heterozygous mutant เพราะสามารถตรวจการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ได้ในแต่ละเซลล์ โดยมีหลักการคือ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสี tetranitro blue tetrasolium (สีฟ้า) ผ่านปฏิกิริยา reduction ของ NADPH เป็นผลึกของ formazan (สีม่วง) ที่เกิดขึ้นใน RBCs ภายใต้กล้อง light microscope ที่ความยาวคลื่น 340 nm ดังนั้นถ้า RBCs มีการทำงานของเอนไซม์ G 6-PD ที่เป็นปกติ จะสามารถเห็นแกรนูลของ erythrocytes ย้อมติดเป็นสีม่วง (53-55) ข้อดีคือ สามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ในแต่ละเซลล์เม็ดเลือดได้ และสามารถแยกลักษณะ genotype ของผู้พร่องเอนไซม์ได้อย่างแม่นยำ แต่มีข้อเสียคือ ใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะที่ไม่เหมาะสมต่อการออกภาคสนาม อีกทั้งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบและวิเคราะห์ผล

#### 2.5 เทคนิคการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD*

##### 2.5.1 PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) (15)

PCR-RFLP สามารถตรวจสอบชนิดการกลายพันธุ์ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ (primer) ให้ครอบคลุมตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ และนำ PCR product มาตรวจสอบชนิดการกลายพันธุ์โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่มีตำแหน่งตัดจำเพาะ (recognition site) กับการกลายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบ และตรวจสอบขนาดของ PCR-RFLP เทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์กับตัวอย่างปกติ ด้วยวิธี gel electrophoresis ทั้งนี้ PCR-RFLP เป็นวิธีพื้นฐานที่สามารถทำได้ง่าย แต่สามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ครั้งละหนึ่งชนิด อย่างไรก็ตามในบางครั้งตำแหน่งที่กลายพันธุ์ไม่พบว่ามีเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดเลยที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่กลายพันธุ์และตัวอย่างปกติได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยการออกแบบ primer ช่วยเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของ PCR product ให้เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดได้ ซึ่งในขั้นตอนดังกล่าวจะมีซับซ้อนในการออกแบบและเพิ่มจำนวน DNA

##### 2.5.2 Allele Specific-PCR (AS-PCR) (12)

เทคนิค AS-PCR อาศัยการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ โดยใช้ primer 2 คู่ต่อการกลายพันธุ์หนึ่งชนิด ซึ่ง primer คู่ที่ 1 จำเพาะต่ออัลลีลปกติ และ primer คู่ที่ 2 จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ชนิดนั้นๆ โดยออกแบบให้มีเบสจำเพาะที่ปลายด้าน 3' ของ reverse primer จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และนำมาแยกด้วย gel electrophoresis ข้อดีคือ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างปกติและตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ได้จากขนาดของ PCR ที่ต่างกันจาก

ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ต่างกัน และสามารถระบุได้ด้วยว่าเป็น homozygote หรือ heterozygote แต่ข้อเสียของวิธีนี้ คือ คัดเลือกอุณหภูมิ (Tm) ที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ได้ลำบากสำหรับการเพิ่มจำนวนอัลลีลปกติและกลายพันธุ์

### 2.5.3 Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot (ASO) (56)

เทคนิค ASO คือ เทคนิค hybridization ที่ใช้วิธีการหยด (dot) สารละลาย DNA สายเดี่ยว (denaturation) ที่ต้องการวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ลงบนไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ที่มีประจุเป็นบวก จากนั้นใส่ probe ที่ติดฉลากด้วย biotin ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์จะมี probe 2 ชนิดต่อหนึ่งการกลายพันธุ์ คือ normal probe และ mutant probe ซึ่ง probe จะจำเพาะต่อลำดับเบสที่ต้องการทดสอบ จากนั้นตรวจ hybridization signal หรือการจับกันของ target DNA กับ probe ด้วยการเติม streptavidin-horseradish peroxidase ซึ่งหาก DNA ตัวอย่างมีลำดับเบสที่จำเพาะกับ probe แล้ว เอนไซม์ horseradish peroxidase ที่มี streptavidin ติดอยู่ ก็จะสามารถเข้าจับกับ biotin ของ probe ได้ ดังนั้นเมื่อใส่สับสเตรท (substrate) หรือ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) ต่อเอนไซม์ peroxidase จึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ผลิตภัณฑ์สีฟ้า (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimine) ในที่มืด เทคนิค ASO มีข้อดี คือ มีความจำเพาะและแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้หลายๆ ชนิดในครั้งเดียวกัน โดยใช้ probe ที่สามารถ hybridize ที่อุณหภูมิเดียวกันได้และใช้เวลาไม่นานหากทำพร้อมกันหลายชนิดการกลายพันธุ์ ข้อเสียคือ มีหลายขั้นตอน

### 2.5.4 Reverse Dot Blot Hybridization (RDB) (14)

เทคนิค RDB อาศัยหลักการเช่นเดียวกับ ASO โดยใช้ probe เช่นเดียวกันแต่ต่างตรงที่นำ probe ที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่อะมิโน (NH<sub>2</sub>) ยึดติดบน nylon membrane ประจุลบ แล้วนำ PCR product ที่ติดฉลาก biotin จากการใช้ primer ติดฉลากด้วย biotin มา hybridize กับ probe บน nylon membrane แล้วตรวจสอบปฏิกิริยา hybridization ระหว่าง probe กับ DNA ผู้ป่วย เช่นเดียวกับวิธี ASO วิธีดังกล่าวมีข้อดี คือสามารถตรวจสอบได้หลายตัวอย่างพร้อมๆ กันในครั้งเดียว และสามารถนำ probe ติดบน nylon membrane รอไว้ได้ก่อนที่จะมี DNA มาทดสอบได้ จึงเหมาะจะนำมาพัฒนาต่อในระดับพาณิชย์

### 2.5.5 DNA sequencing (13, 57)

Dideoxynucleotide chain termination method เป็นวิธีที่พัฒนาโดย Sanger และคณะ ในปี 1977 โดยอาศัยไดออกซีนิวคลีโอไทด์ (dideoxynucleotide; ddNTP) หยุดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย DNA (DNA polymerization) ด้วยโครงสร้างของ dideoxynucleotide ที่ขาดหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในตำแหน่งคาร์บอนที่ 2' และ 3' จึงทำให้พันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์

(phosphodiester) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนที่ 3' ของไดออกซีนิวคลีโอไทด์และหมู่ฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์ตัวที่จะต่อเข้าไปใหม่ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ จึงทำให้ปฏิกิริยาหยุดลง ด้วยหลักการดังกล่าวจึงนำมาใช้หาลำดับเบสและการกลายพันธุ์ได้ วิธีดังกล่าวสามารถตรวจสอบชนิดของการกลายพันธุ์และสามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ แต่มีราคาแพง



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างที่สุ่มนำมาใช้ในการศึกษามีจำนวน 199 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศชาย 190 ตัวอย่าง และเพศหญิง 9 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่าง DNA ที่คงเหลือจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยมาลาเรีย ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน ภายใต้การดูแลของศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศรีวิชา ครุฑสูตร ภาควิชาสูติวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล การวิจัยนี้ได้รับการรับรองการพิจารณาจริยธรรมโครงการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย IRB No. 280/56 ทั้งนี้ตัวอย่าง DNA ทั้งหมดถูกเก็บอยู่ในอุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ณ ห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยาโมเลกุล 828 ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้ผ่านการตรวจสอบชนิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี PCR-RFLP แล้วพบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด *G6PD Viangchan* (871 G>A) 19 ตัวอย่าง *G6PD Mahidol* (487 G>A) 14 ตัวอย่าง *G6PD Kaiping* (1388 G>A) 16 ตัวอย่าง และ *G6PD Canton* (1376 G>T) 14 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 63 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างปกติที่ไม่พบการกลายพันธุ์ใดๆ 136 ตัวอย่าง

#### 3.2 การยืนยันการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Direct sequencing (Sanger's method) (58)

##### 3.2.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction: PCR)

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ primer ที่คร่อมตำแหน่งการกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้ผลผลิต PCR สำหรับทำ DNA sequencing โดยใช้ primer (Integrated DNA Technologies, Inc., CO, USA) โดยเตรียม PCR ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ความเข้มข้นสุดท้ายของ Master ดังนี้ 1X PCR buffer (Vivantis Technologies, USA), 2.5 U Taq DNA Polymerase (Vivantis Technologies, USA), 20 ng forward primer, 20 ng reverse primer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Vivantis Technologies, USA), 200  $\mu\text{M}$  dNTPs (Vivantis Technologies, USA) และ 50 ng/ $\mu\text{l}$  DNA template ซึ่ง PCR condition และ primer ที่ใช้ในการวิจัยมีลำดับเบสและขนาด PCR product ของแต่ละ exon ดังตารางที่ 4 และบริเวณตำแหน่งของยีน *G6PD* ที่ primer เข้าจับแสดงดังรูปที่ 6

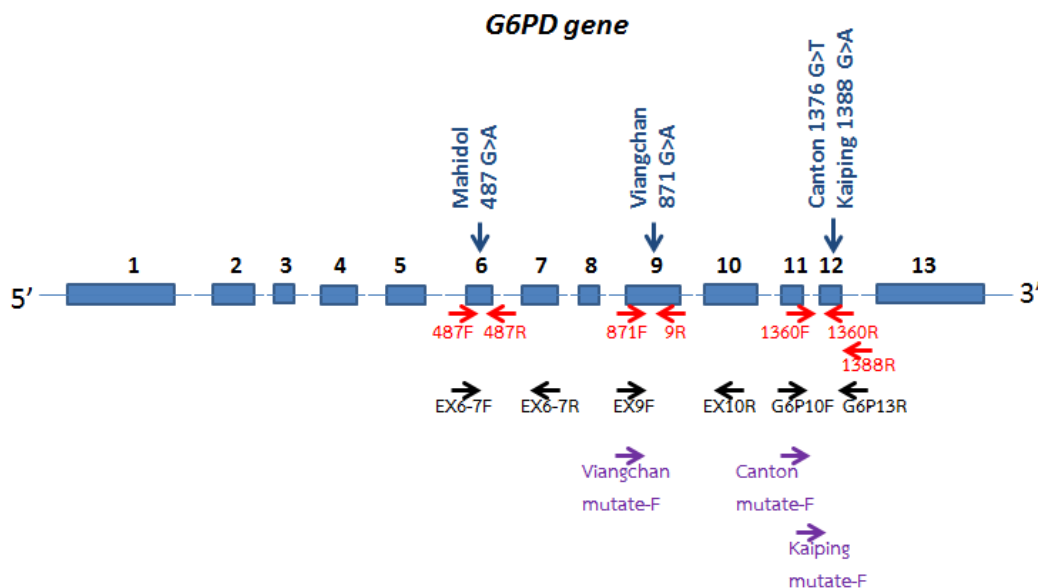
## PCR condition

94 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 35 รอบ
94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
62 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	7 นาที	
25 องศาเซลเซียส	รักษาอุณหภูมิก่อนการวิเคราะห์ PCR product ( $\infty$ )	

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของ primer และขนาด PCR product สำหรับตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Direct sequencing

ชนิดการกลายพันธุ์	primer	ลำดับเบสของ primer 5' → 3'	PCR product size (bp)
G6PD Mahidol (487G>A)	487F	GCGTCTGAATGATGCAGCTCTGAT	104
	487R	CTCCACGATGATGCGGTTCAAGC	
G6PD Viangchan (871G>A)	871F	TGGCTTTCTCTCAGGTCTAG	126
	9R	GTCGTCCAGGTACCCTTTGGGG	
G6PD Canton (1376G>T)	1360F	ACGTGAAGCTCCCTGACGC	214
	1360R	GTGAAAATACGCCAGGCCTTA	
G6PD Kaiping (1388G>A)	1360F	ACGTGAAGCTCCCTGACGC	227
	1388R	GTGCAGCAGTGGGGTGAACATA	





### รูปที่ 6 ตำแหน่งของ primer บนยีน G6PD

โดยตำแหน่งของ exon คือบริเวณที่เป็นกล่องสีฟ้า บริเวณที่เป็นลูกศรสีแดงคือตำแหน่งของ primer สำหรับตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Direct sequencing บริเวณที่เป็นลูกศรดำคือตำแหน่งของ primer ในการสังเคราะห์ปริมาณสารพันธุกรรมแต่ละ exon เพื่อทำASO และบริเวณที่เป็นลูกศรสีม่วงคือตำแหน่งของ primer ที่ออกแบบให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ (mutagenic primer)

### 3.2.2 Gel Electrophoresis

ตรวจสอบ PCR product ด้วย electrophoresis โดยใช้ agarose gel (1<sup>st</sup> BASE Laboratories Sdn Bhd, SG) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 หยอดตัวอย่างโดยใช้ PCR product ปริมาตร 5 µl และ 6x loading buffer (GeneDireX, China) ปริมาตร 1 µl ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปถ่ายรูปด้วยเครื่อง Molecular Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR<sup>+</sup> (BIO-RAD, USA) โดยใช้โปรแกรม Image Lab<sup>™</sup> บันทึกผลและถ่ายภาพที่เกิดขึ้น

### 3.2.3 การทำ DNA ให้บริสุทธิ์ (DNA purification)

ทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield<sup>™</sup> Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้ (59)

#### 3.2.3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

เติมสารละลาย DF buffer ปริมาตร 5 เท่าของ PCR product ลงไปผสมกับ PCR product ในหลอด microcentrifuge (Heathrow Scientific, USA) ผสมให้เข้ากัน

### 3.2.3.2 การจับของ DNA (DNA binding)

ดูดสารละลายข้อ 3.2.3.1 ลงในคอลัมน์ (DF column) ที่อยู่ใน Collection tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง หรือ 25 องศาเซลเซียส เติสารละลายส่วนใสที่ไหลผ่าน column ที่

### 3.2.3.3 การล้าง (Wash)

เติมสารละลาย wash buffer ลงไปใน DF column ปริมาตร 600  $\mu$ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง เติส่วนใสที่ไหลผ่าน column ที่ และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดสารละลายให้หมด และเพื่อทำให้ column แห้ง

### 3.2.3.4 การละลาย DNA (DNA Elution)

จากนั้นย้าย DF column ที่แห้งแล้วมาใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 20-50  $\mu$ l ลงไปบริเวณกึ่งกลางของ column ที่ไว้ 2-4 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สารละลายซึมเข้าสู่ส่วนของ matrix ภายใน column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ DNA ไหลผ่าน column จะได้ DNA ที่มีความบริสุทธิ์

## 3.2.4 วัดความเข้มข้นของ PCR product

วัดความเข้มข้นของ PCR product ด้วย Nano drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) และเจือจาง DNA ด้วยสารละลาย TE buffer ให้มีความเข้มข้น 40 ng/ $\mu$ l ก่อนนำส่ง Sequencing (Macrogen Inc, Korea)

## 3.2.5 การอ่านผลลำดับเบส

นำผล DNA sequencing มาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์เทียบกับฐานข้อมูล อีกทั้งใช้ข้อมูลจาก chromatogram ร่วมในการวิเคราะห์โดยใช้ฐานข้อมูล FASTA จาก genomic DNA ของยีน *G6PD* ในมนุษย์ (H.sapiens *G6PD* gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase) Genbank รหัส X55448.1

## 3.3 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี ASO

### 3.3.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction: PCR)

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *G6PD* โดยใช้ primer หลายเส้นในหลอดเดียว (single-tube multiplex-PCR) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์หลายตำแหน่งพร้อมๆ กัน โดยเตรียม PCR ปริมาตร 20  $\mu$ l ความเข้มข้นสุดท้ายของ Master mix ดังนี้ 1X PCR buffer (Vivantis

Technologies, USA), 2.5 U Taq DNA Polymerase (Vivantis Technologies, USA), 20 ng forward primer (Integrated DNA Technologies, Inc., CO, USA), 20 ng reverse primer (Integrated DNA Technologies, Inc., CO, USA), 1.0 mM MgCl<sub>2</sub> (Vivantis Technologies, USA), 200 μM dNTPs (Vivantis Technologies, USA), betaine 1U (Sigma Life Sciences, USA) และ 50 ng/μl DNA template ซึ่ง primer ที่ใช้ในการวิจัยมีลำดับเบสและขนาด PCR product ของแต่ละ exon ดังตารางที่ 5 และ ลำดับ nucleotide ของ mutagenic primer ที่ออกแบบให้มีตำแหน่งของการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ และขนาดผลิตภัณฑ์ของแต่ละ exon ดังตารางที่ 6 และบริเวณตำแหน่งของยีน *G6PD* ที่ primer เข้าจับแสดงดังรูปที่ 6

ตารางที่ 5 ลำดับ nucleotide ของ primer และขนาดผลิตภัณฑ์ของแต่ละ exon

ตำแหน่งการกลายพันธุ์	primer	ลำดับเบสของ primer 5'→3'	PCR product size (bp)
487G>A	EX6-7-F	ACACAAGGCACGGGAGGT	697 bp
	EX6-7-R	GAGGAGCTCCCCAAGATAG	
871G>A	EX9-F	TTCTCTCCCTTGGCTTTCTC	612 bp
	EX10-R	CACACTGCTCCTTCTCTGTA	
1376 G>T,	G6P10-F	GAAGCCGGCATGTTCTTCAA	641 bp
		C	
1388 G>A	G6P13-R	CCAGGGCTCAGAGCTTGTG	

เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์แต่ละชนิดที่ต้องการนั้นมีจำนวนน้อย จึงได้ทำการสังเคราะห์สาย DNA ที่มีการกลายพันธุ์ชนิดที่ต้องการในหลอดทดลองแทน โดยอาศัยหลักการเพิ่มจำนวน DNA ของ mutagenic primer ที่มีตำแหน่งชนิดการกลายพันธุ์ที่ต้องการเพื่อใช้เป็น positive control (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ลำดับ nucleotide ของ mutagenic primer ที่ออกแบบให้มีตำแหน่งของการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ และขนาดผลิตภัณฑ์ของแต่ละ exon

ชนิดการกลายพันธุ์	primer	ลำดับเบสของ primer 5' → 3'	PCR (bp)	product
G6PD Viangchan	mutate-F	CTTTCTCTCAGGTCAAGATGTTG	599	
	mutate-R	CACACTGCTCCTTCTCTGTA		
G6PD Canton	mutate-F	CAGCGACGAGCTCCTTGAG	291	
	mutate-R	CCAGGGCTCAGAGCTTGTG		
G6PD Kaiping	mutate-F	CCGTGAGGCCTGGCATATTTTC	279	
	mutate-R	CCAGGGCTCAGAGCTTGTG		

#### PCR condition

94 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 35 รอบ
95 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
65 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
73 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	7 นาที	
25 องศาเซลเซียส	รักษาอุณหภูมิก่อนการวิเคราะห์ PCR product (∞)	

#### 3.3.2 Gel Electrophoresis

ตรวจสอบ PCR product ด้วย gel electrophoresis โดยเตรียม polyacrylamide gel (BIO-RAD, CA) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 ดังตารางที่ 7 ทิ้งไว้ 30 นาที หยอดตัวอย่างโดยใช้ PCR product ปริมาตร 5  $\mu$ l และ 6x loading buffer (GeneDireX, China) ปริมาตร 1  $\mu$ l ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที นำเจลไปถ่ายรูป band ด้วยเครื่อง Molecular Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR<sup>+</sup> (BIO-RAD, USA) โดยใช้โปรแกรม Image Lab<sup>™</sup> บันทึกผลและถ่ายภาพที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 7 ส่วนผสมของ polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8

ชื่อสารเคมี	ปริมาณ (ml)
dH <sub>2</sub> O	3.62
29% acrylamide gel (BIO-RAD, CA)	1.86
10% Ammonium persulphate (USB Corporation, USA)	0.05
5X TBE	1.40
TEMED (BIO-RAD, USA)	0.07
รวม	7

### 3.3.3 Hybridization

#### 3.3.3.1 ขั้นตอนการเตรียม membrane (60)

ใช้ positive charge nylon membrane (Hybond N+) (Amersham Biosciences, UK) โดยให้มีพื้นที่ขนาด 1.5x1.5 ตารางเซนติเมตรต่อการหยด DNA 1 ตัวอย่าง (ในการทำทุกครั้งมีตัวอย่างที่เป็น positive control เสมอ) ใช้ PCR product ความเข้มข้น 33.6 ng/μl (11.2 ng/μl ของแต่ละ fragment ทั้งหมด 3 fragment) ปริมาตรทั้งหมด 10 μl ซึ่งความเข้มข้นของ DNA ได้มาจากการเทียบความเข้มข้นกับ DNA ladder ใน gel electrophoresis

ทั้งนี้ลำดับ nucleotide ของ normal probe และ mutant probe ออกแบบจากโปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., CO, USA) โดยให้บริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์อยู่บริเวณกึ่งกลางของความยาว probe และให้เข้าคู่สมกับลำดับ nucleotide ของยีน *G6PD* ดังแสดงใน ตารางที่ 8 ส่วน  $T_m$  ของการ hybridization นั้น คือ  $T_m$  ของ probe ที่ลดอุณหภูมิให้ต่ำลง ซึ่งสูตรคำนวณ  $T_m$  ของ probe (41) ดังแสดงต่อไปนี้

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log (NA^+)) + 0.41(\%GC) - 500N$$

โดยที่ (NA<sup>+</sup>) หมายถึง ความเข้มข้นของเกลือ sodium citrate ที่ใช้ คือ 0.1 M  
N หมายถึง ลำดับ nucleotide ของ probe หรือ ความยาว probe

ตารางที่ 8 ลำดับ nucleotide ของ normal probe และ mutation probe

Probe	ลำดับเบสของ probe (5'→3')	T <sub>m</sub> probe (°C)	T <sub>m</sub> hybridize (°C)	%GC
G6PD- Mahidol	Normal: 5-NH <sub>2</sub> - TGCGGTTCCAGCCTCTGCT Mutation: 5-NH <sub>2</sub> - TGCGGTTCCAGCTTCTGCT	62.1 59.8	65 47	63.2 57.9
G6PD- Viangchan	Normal: 5-NH <sub>2</sub> - ATTTCAACACCTTGACCTGA Mutation: 5-NH <sub>2</sub> - ATTTCAACACTTTGACCTGA	48.6 49.7	44 47	38.9 35.0
G6PD- Canton	Normal: 5-NH <sub>2</sub> -GCCTCAAGGAGCTCG Mutation: 5-NH <sub>2</sub> -GCCTCAAGAAGCTCG	55.4 53.6	57 57	73.3 66.7
G6PD- Kaiping	Normal: 5-NH <sub>2</sub> - AAAATACGCCACGCCTCA Mutation: 5-NH <sub>2</sub> - AAAATACGCCATGCCTCA	54.4 52.1	57 57	50.0 44.4

### 3.3.3.2 ขั้นตอนการตรึง DNA บนเมมเบรน

นำ PCR product มาแยก DNA ให้เป็นสายเดี่ยวโดยการนำไป heat ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยดลงบน nylon membrane หยดทีละ 1 µl ทั้งหมด 10 µl รอให้แห้ง จากนั้นตรึง DNA โดยการบ่มที่เครื่อง UV transilluminator (Cleaver Scientific Ltd, UK) ที่ความยาวคลื่น 245 nm เป็นเวลา 4 นาที (UV-crosslinker) โดย UV ช่วงคลื่นสั้นจะเป็นตัวกระตุ้นให้หมู่ nitrogenous base ของ DNA มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาและสร้างพันธะ covalent กับหมู่ amine บนพื้นผิวของ nylon membrane เพื่อให้ DNA สามารถจับกับ nylon membrane ได้ดีขึ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในขั้นตอน hybridization ต่อได้หรือเก็บ nylon membrane ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะใช้งาน

### 3.3.3.3 ขั้นตอนการเตรียม probe

เตรียม probe ให้มีปริมาณเนื้อสารสุดท้าย (final amount) 2.3 nMol (Nanomole) ทั้งนี้ได้ทำการเจือจางปริมาณของ probe ในหลายปริมาณ โดยให้มีปริมาณเนื้อสารสุดท้ายที่ 0.23 nMol,

2.3 nMol และ 23 nMol เพื่อทดสอบปริมาณเนื้อสารสุดท้ายที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถแปรผลการทดสอบ ASO ได้ชัดเจนที่สุด และพบว่าที่ปริมาณ 2.3 nMol เป็นปริมาณเนื้อสารสุดท้ายที่น้อยที่สุดที่ยังให้ผลการทดสอบ ASO ชัดเจน วิธีการเตรียม probe คือ นำ stock 100  $\mu\text{M}$  ของ probe (Integrated DNA Technologies, Inc., CO, USA) แต่ละชนิดการกลายพันธุ์ ปริมาตร 23.42  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , TE buffer 650  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  และ 10mM EDTA ปริมาตรเป็น 1:1 เท่าของปริมาตรของ probe และ TE buffer รวมกัน นำไปผสมให้เข้ากันจะได้ปริมาณเนื้อสารสุดท้ายของ probe คือ 2.3 nMol จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

#### 3.3.3.4 ขั้นตอนการ Hybridization

นำ nylon membrane ที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 มาแช่ใน hybridization solution (4X SSPE + 0.5% SDS) ปริมาตร 1  $\text{ml}/\text{cm}^2$  ของ membrane ผสมกับ probe ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.3 เขย่าที่อุณหภูมิตามตารางที่ 8 เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย washing solution1 (1X SSPE + 0.2% SDS) ปริมาตร 1  $\text{ml}/\text{cm}^2$  ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้าย membrane มาล้างด้วย washing solution2 (2X SSPE + 0.5% SDS) ปริมาตร 1  $\text{ml}/\text{cm}^2$  เขย่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า  $T_m$  ของ probe 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 3.3.3.5 ขั้นตอนการทำให้เกิดสี

ย้าย membrane จากข้อ 3.3.3.4 มาใส่ใน 1X SSPE ปริมาตร 5  $\text{ml}/\text{cm}^2$  ที่ผสมอยู่กับ streptavidin-HRP ปริมาตร 0.5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย 1X SSPE + 0.2% SDS ปริมาตร 2  $\text{ml}/\text{cm}^2$  เขย่าเป็นเวลา 2 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นย้าย membrane มาล้างใน 100 mM sodium citrate ปริมาตร 2  $\text{ml}/\text{cm}^2$  เขย่าเป็นเวลา 2 นาที จำนวน 3 รอบ ย้าย membrane มาแช่ใน 0.1 mg/ml TMB ปริมาตร 0.3  $\text{ml}/\text{cm}^2$  ที่ผสมกับ 100 mM sodium citrate ปริมาตร 2.5  $\text{ml}/\text{cm}^2$  เขย่าและบ่มในที่มืดนาน 30 นาที สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลง

### 3.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

#### 3.3.4.1 การวิเคราะห์ผล DNA Sequencing

นำ DNA sequence ของแต่ละ exon มาวิเคราะห์ลำดับเบสที่เปลี่ยนไปโดยการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 ร่วมกับ genomic DNA ของยีน *G6PD* Human จาก Genbank รหัส X55448.1

#### 3.3.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลผลการทำ ASO

วิเคราะห์ข้อมูลโดยคำนวณค่า sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) ของ probe (61) ดังแสดงตารางที่ 9 โดย

Sensitivity เป็นสัดส่วนของตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ชนิดนั้นๆ เมื่อทดสอบแล้วได้ผลบวก (positive) ค่า sensitivity มีค่าเท่ากับ true positive/all mutant ( $a/a+c$ ) โดยค่า sensitivity ทดสอบความสามารถในการตรวจพบตัวอย่างที่พบชนิดการกลายพันธุ์นั้นๆ หากค่า sensitivity มาก แสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบมีความสามารถในการตรวจพบตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์มาก

Specificity เป็นสัดส่วนของตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบแล้วได้ผลลบ (negative) ค่า specificity มีค่าเท่ากับ true negative/ all no mutant ( $d/b+d$ ) โดยค่า specificity ทดสอบความสามารถในการค้นหาตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ชนิดนั้นๆ หากค่า specificity มาก แสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบมีความสามารถในการคัดกรองตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์ได้มาก

Positive predictive value (PPV) คือ สัดส่วนของจำนวนผลการตรวจจากตัวอย่างที่กลายพันธุ์แล้วได้ผลบวกจริงต่อจำนวนผลการตรวจที่ให้ผลเป็นบวกทั้งหมด โดยนับรวมผลบวกลวงด้วย

Negative predictive value (NPV) คือ สัดส่วนของจำนวนผลการตรวจจากตัวอย่างที่ไม่พบการกลายพันธุ์แล้วได้ผลลบจริงต่อจำนวนผลการตรวจที่ให้ผลเป็นลบทั้งหมด

**ตารางที่ 9** ตารางคำนวณค่า Sensitivity, Specificity, Positive predictive value และ

Negative predictive value

	Mutant	No Mutant	
Test positive	True positive (a)	False positive (b)	Positive predictive value (PPV) ( $a / a+b$ )
Test negative	False negative (c)	True Negative (d)	Negative predictive value (NPV) ( $d / c+d$ )
	Sensitivity ( $a / a+c$ )	Specificity ( $d / b+d$ )	



## บทที่ 4

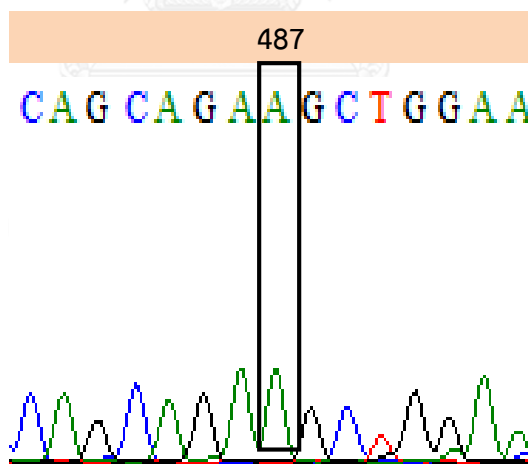
## ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

## 4.1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ศึกษา

ทำการสุ่มตัวอย่าง DNA จำนวนทั้งหมด 199 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเพศชาย 190 ตัวอย่าง และเพศหญิง 9 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์จำนวน 63 ตัวอย่าง ได้แก่ชนิด G6PD Viangchan (871 G>A) 19 ตัวอย่าง G6PD Mahidol (487 G>A) 14 ตัวอย่าง G6PD Kaiping (1388 G>A) 16 ตัวอย่าง และ G6PD Canton (1376 G>T) 14 ตัวอย่าง และไม่พบการกลายพันธุ์อีก 136 ตัวอย่าง

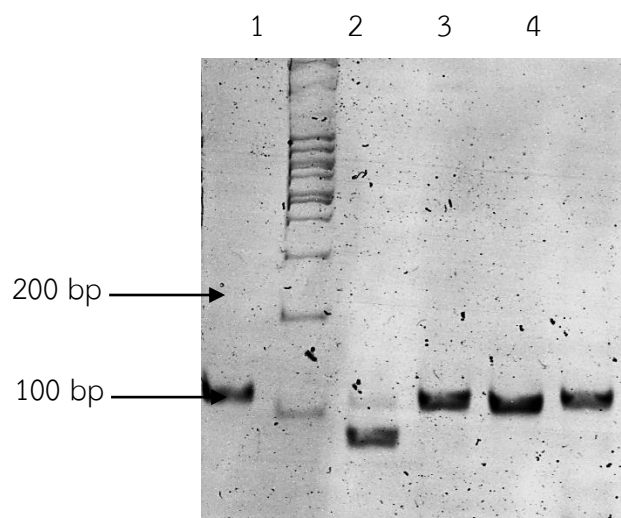
4.2 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ด้วยวิธี direct sequencing & PCR-RFLP

จากการยืนยันการกลายพันธุ์ของตัวอย่างด้วย direct sequencing พบรูปแบบการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ เป็นไปตามผลจากการศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP ที่ได้ทำไว้ก่อนหน้านี้ ดังแสดงรูปที่ 7-15



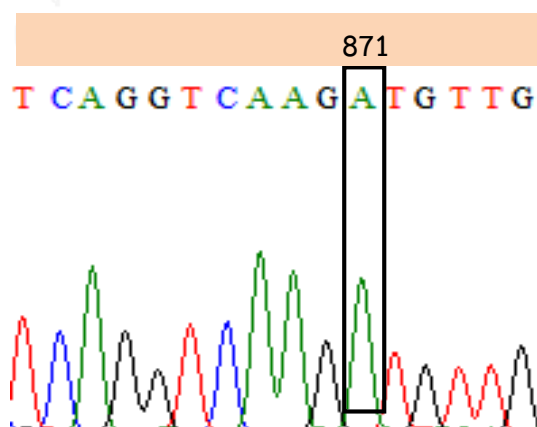
รูปที่ 7 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศชาย (GD008) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol (487G>A) ด้วยวิธี RFLP

ซึ่งพบลักษณะ hemizygote ของการเปลี่ยนเบส G ไปเป็น A ในตำแหน่งที่ 487 ใน exon 6 ด้วยวิธี direct sequencing



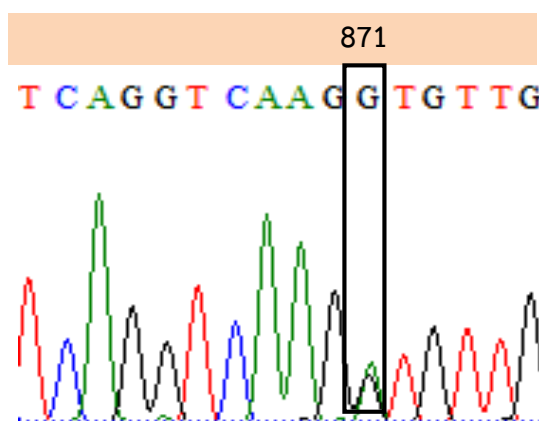
รูปที่ 8 แสดงผล PCR-RFLP จากการทำ 8% polyacrylamide gel electrophoresis ของการกลายพันธุ์ชนิด Mahidol

เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III จะพบ DNA ขนาด 82 และ 22 bp lane1 แสดง ตัวอย่างปกติ (GD016), lane2 แสดง 100bp DNA ladder, lane3 แสดงตัวอย่างเพศชาย (GD008) ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol แบบ hemizygote (uncompleted cut) และ lane 4,5,6 แสดงตัวอย่างปกติเพศชาย (GD025, GD032 และ GD039 ตามลำดับ)



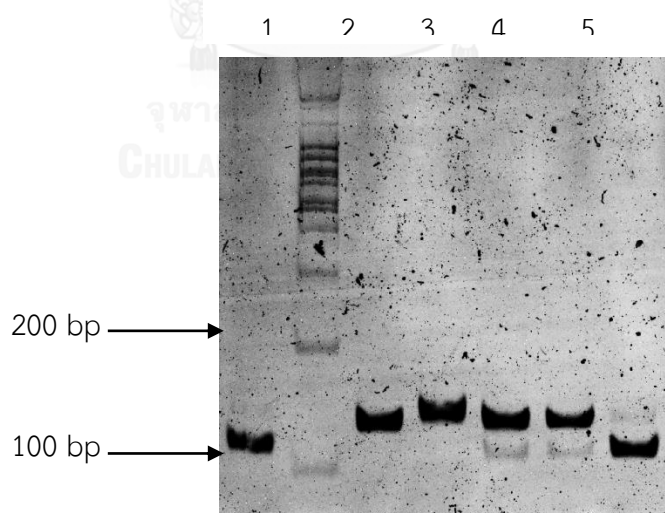
รูปที่ 9 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศชาย (H49) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan (871G>A) ด้วยวิธี RFLP

ซึ่งพบลักษณะ hemizygote ของการเปลี่ยนเบส G ไป A ในตำแหน่งที่ 871 ใน exon 9 จาก direct sequencing



รูปที่ 10 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศหญิง (H27) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan (871G>A) ด้วยวิธี RFLP

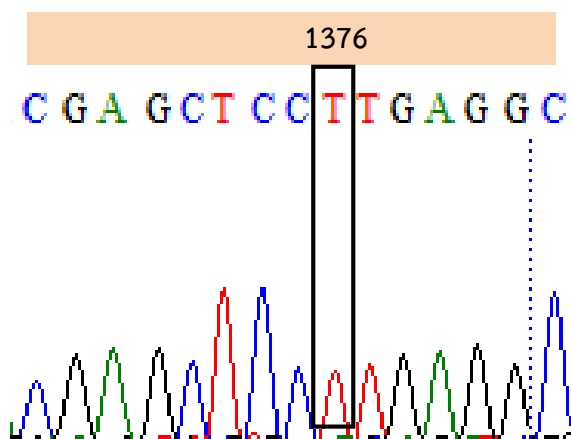
ซึ่งพบลักษณะ heterozygote ของการเปลี่ยนเบส G ไป A ในตำแหน่งที่ 871 ใน exon 9 จาก direct sequencing



รูปที่ 11 แสดงผล PCR-RFLP จากการทำ 8% polyacrylamide gel electrophoresis ของการกลายพันธุ์ชนิด Viangchan

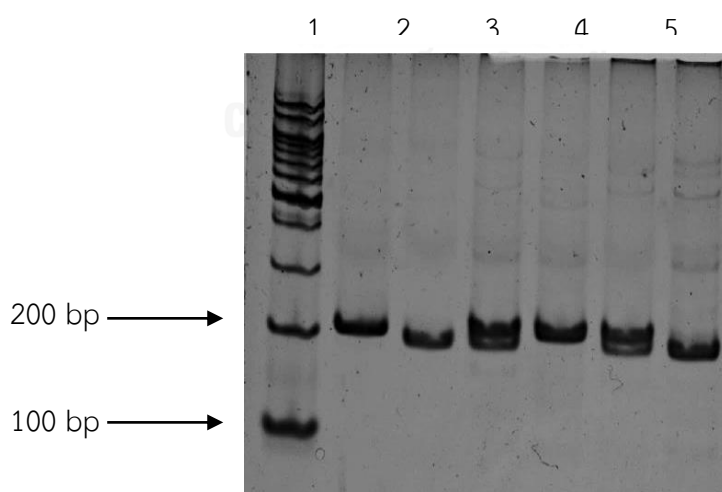
เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ XbaI จะพบ DNA ขนาด 106 และ 20 bp lane1 แสดง positive control ของตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ชนิด Viangchan (GD192), lane2 แสดง 100bp DNA ladder,

lane3,4 แสดงตัวอย่างปกติ (H3,H5), lane5, 6 แสดงตัวอย่างเพศหญิง (H27 และ H32) ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan แบบ heterozygote และ lane 7 แสดงตัวอย่างเพศชาย (H49) ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan แบบ hemizygote



รูปที่ 12 แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศชาย (S181) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton (1376G>T) ด้วยวิธี RFLP

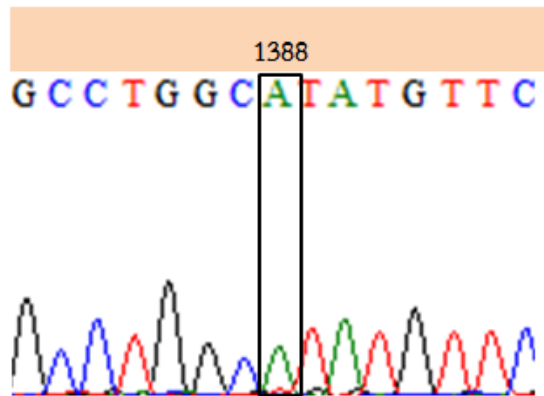
ซึ่งพบลักษณะ hemizygote ของการเปลี่ยนเบส G ไปเป็น T ในตำแหน่งที่ 1376 ใน exon 12 ด้วยวิธี direct sequencing



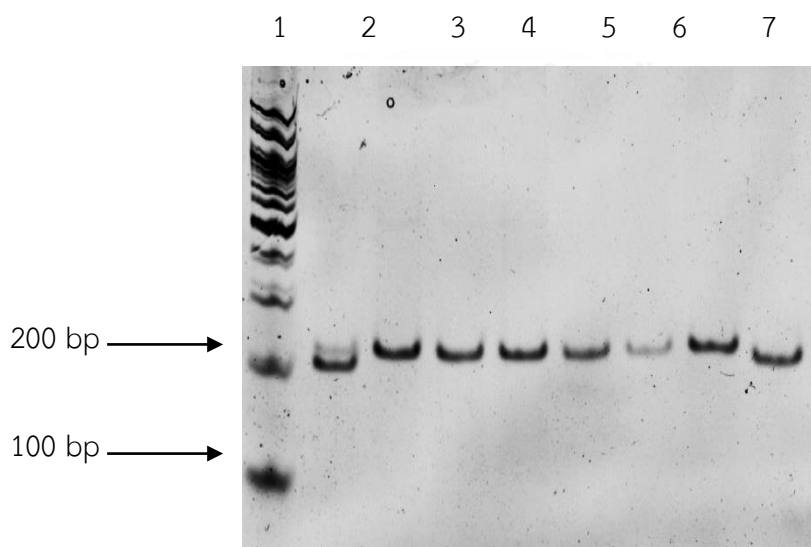
รูปที่ 13 แสดงผล PCR-RFLP จากการทำ 8% polyacrylamide gel electrophoresis ของการกลายพันธุ์ชนิด Canton

เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ AflII จะพบ DNA ขนาด 194 และ 20 bp lane1 แสดง 100bp DNA ladder, lane2 แสดงขนาด PCR (S117 uncut), lane3 แสดงตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton

(S117), lane4,6 แสดงตัวอย่างปกติซึ่งพบว่า band หนาจนคล้าย band ที่กลายพันธุ์ แต่เมื่อนำไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นๆ แล้วไม่พบการกลายพันธุ์ (S112 และ S125 ตามลำดับ) lane5 แสดงตัวอย่างปกติ (S122) และ lane7 แสดงตัวอย่างเพศชายที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton รูปแบบ hemizygote (S181)



**รูปที่ 14** แสดง Chromatogram ของตัวอย่างเพศชาย (GD274) ที่พบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping (1388G>A) ด้วยวิธี RFLP ซึ่งพบลักษณะ hemizygote ของการเปลี่ยนเบส G ไปเป็น A ในตำแหน่งที่ 1388 ใน exon 12 ด้วยวิธี direct sequencing



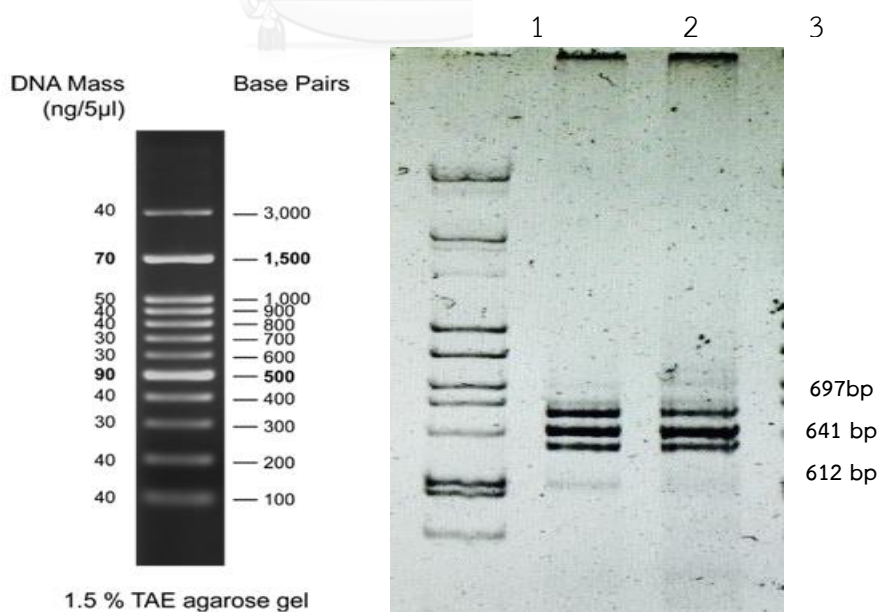
**รูปที่ 15** แสดงผล PCR-RFLP จากการทำ 8% polyacrylamide gel electrophoresis ของการกลายพันธุ์ชนิด Kaiping

เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ NdeI จะพบ DNA ขนาด 206 และ 21 bp lane1 แสดง 100bp DNA ladder, lane2 แสดงตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping (N-Kaiping) ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping รูปแบบ hemizygote (uncompleted cut), lane3-8 แสดงตัวอย่างปกติ (GD96, GD145, GD208, GD214, GD121 และ GD226 ตามลำดับ) และ lane9 แสดงตัวอย่างเพศชาย (GD274) ที่มีการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping รูปแบบ hemizygote

#### 4.3 ผลการตรวจการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot (ASO)

##### 4.3.1 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (single-tube multiplex-PCR)

จากการทำ multiplex-PCR ได้ PCR product ของ G6PD Viangchan (exon 9-10) ขนาด 612 bp, G6PD Canton และ G6PD Kaiping (exon 11-13) ขนาด 641 bp และ G6PD Mahidol (exon 6-7) ขนาด 697 bp โดยใช้ 1% agarosse gel electrophoresis โดยเตรียม PCR product ปริมาตร 5  $\mu$ l ผสมกับ 6X loading buffer (GeneDireX, China) ปริมาตร 1  $\mu$ l โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 45 นาที จากนั้นนำเจลไปถ่ายรปด้วยเครื่อง Molecular Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR<sup>+</sup> (BIO-RAD, USA) โดยใช้โปรแกรม Image Lab<sup>™</sup> บันทึกผลและถ่ายภาพที่เกิดขึ้น เมื่อเทียบความเข้มของ band ของ PCR product กับ 100 bp DNA ladder แต่ละ fragment แล้วพบว่า PCR product ของแต่ละ fragment มีความเข้มข้นประมาณ 11.2 ng/ $\mu$ l (รูปที่16)



รูปที่ 16 แสดงผลการตรวจสอบความเข้มข้นของ PCR product เทียบกับ marker ด้วย 1% agarosse gel electrophoresis

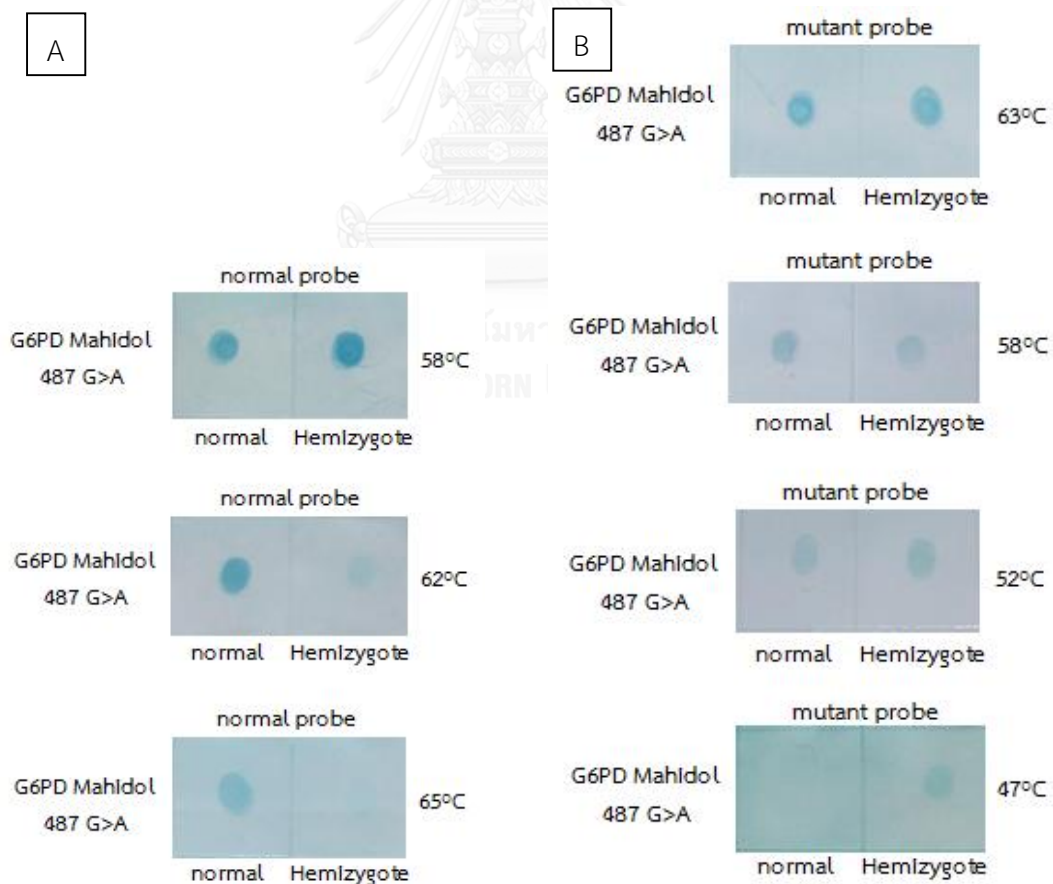
โดยเตรียม PCR product ปริมาตร 5  $\mu$ l ผสมกับ 6X loading buffer (GeneDireX, China) ปริมาตร 1  $\mu$ l และโหลดตัวอย่างทั้งหมดลงเจล Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder Lane 2 และ 3 คือ PCR product ของตัวอย่าง GD34 และ GD37 ตามลำดับ แสดง exon 9-10 ขนาด 612 bp, exon 11-13 ขนาด 641 bp และ exon 6-7 ขนาด 697 bp

### 4.3.2 ปัจจัยที่มีต่อการ hybridization

ปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการตรวจการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค ASO ได้แก่

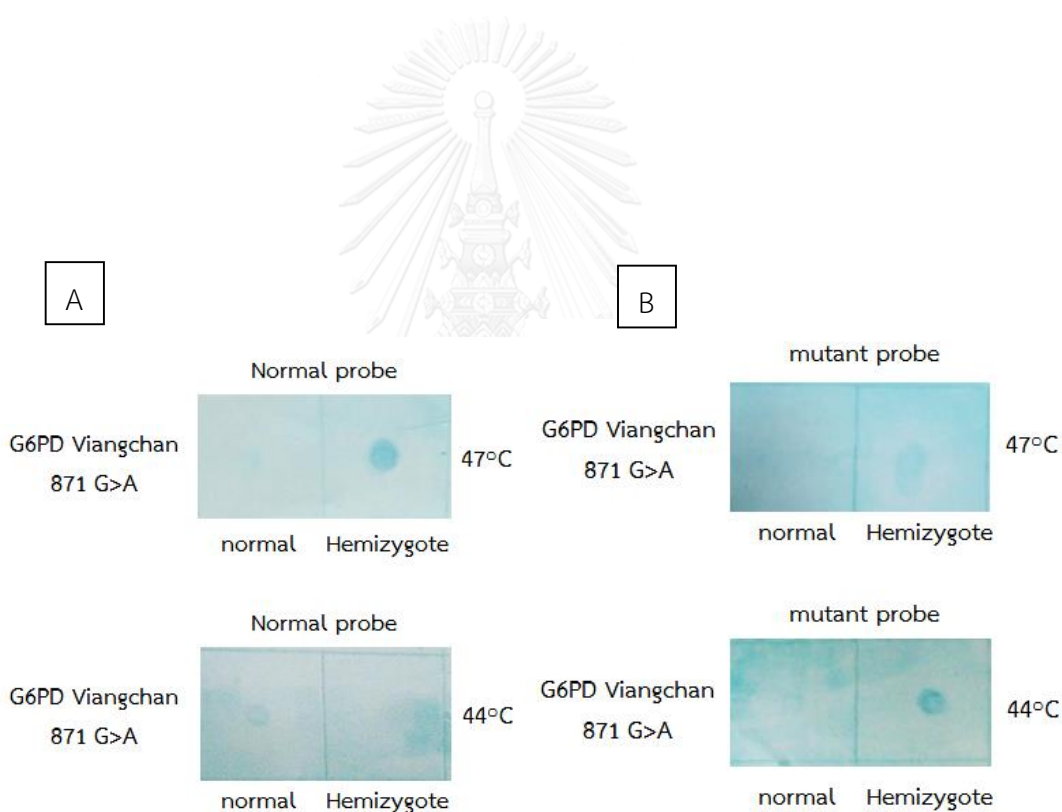
#### 4.3.2.1 อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับขั้นตอนการ hybridization ช่วยให้ probe จับกับ DNA target ได้ ซึ่งในเบื้องต้นได้ปรับอุณหภูมิในการ hybridization ของ probe โดยยึดตามค่า  $T_m$  ของ probe แต่ ละชนิดเป็นหลัก หลังจากนั้นจะค่อยๆ ปรับอุณหภูมิขึ้นหรือลงทีละ 2 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการ hybridization ดังรูปที่ 17-20 และสรุปอุณหภูมิที่เหมาะสมดังตารางที่ 10



รูปที่ 17 แสดงผลการทำ ASO ของ G6PD Mahidol

รูป A เป็นการ hybridization ของ normal probe โดยมีการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการ hybridization ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 58°C, 62°C และ 65°C ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 58°C และ 62°C จะปรากฏผลบวกปลอม (false positive) เกิดขึ้น โดยขึ้นทั้ง 2 ชนิดของ probe ดังนั้นที่อุณหภูมิ 65°C จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization สำหรับ normal probe ของ G6PD Mahidol และรูป B เป็นการ hybridization ของ mutant probe โดยมีการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการ hybridization ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 63°C, 58°C, 52°C และ 47°C ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 63°C, 58°C และ 52°C จะปรากฏผลบวกปลอม (false positive) เกิดขึ้น ดังนั้นที่อุณหภูมิ 47°C จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization สำหรับ mutant probe ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol

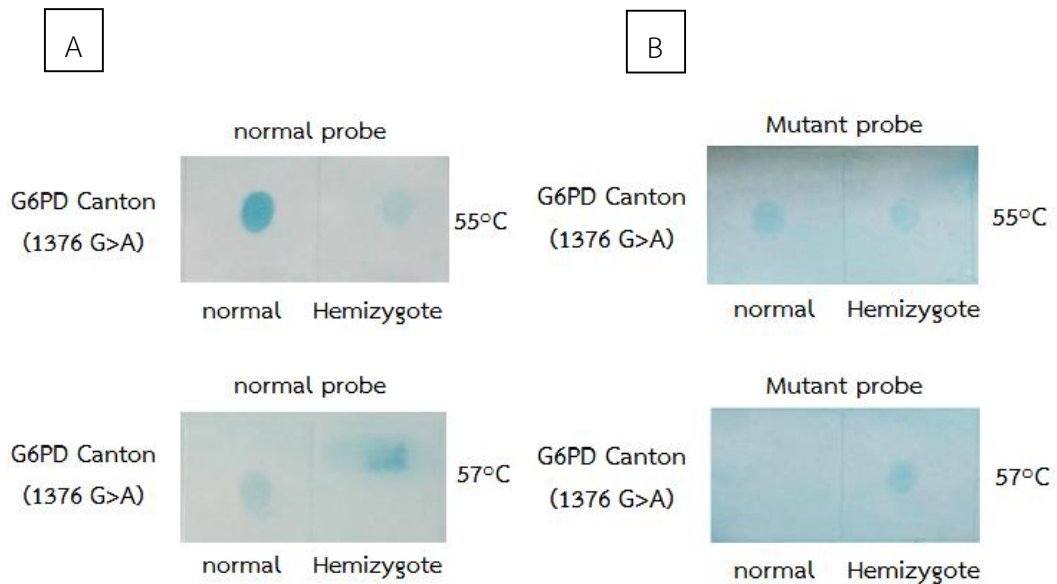


**รูปที่ 18** แสดงผลการทำ ASO ของ G6PD Viangchan

รูปA เป็นการ hybridization ของ normal probe โดยมีการปรับอุณหภูมิในการ hybridization ที่อุณหภูมิ 47°C และ 44°C ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 47°C จะปรากฏผล false positive ดังนั้นที่อุณหภูมิ 44°C จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization รูปB เป็นการ hybridization ของ mutant probe โดยมีการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการ hybridization ที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 47°C และ 44°C ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 44°C จะปรากฏผลบวกปลอม (false positive)

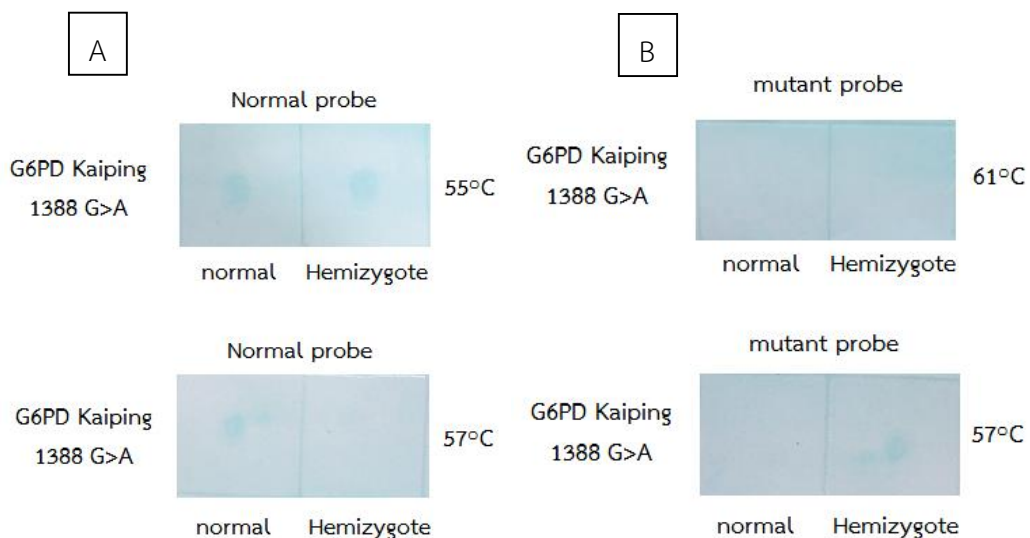


เกิดขึ้น ดังนั้นที่อุณหภูมิ 47°C จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization สำหรับ mutant probe ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan



รูปที่ 19 แสดงผลการทำ ASO ของ G6PD Canton

รูปA เป็นการ hybridization ของ normal probe และรูปB เป็นการ hybridization ของ mutant probe โดยทั้ง 2 รูปมีการปรับอุณหภูมิในการ hybridization ที่อุณหภูมิ 55°C และ 57°C ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 55°C จะปรากฏผล false positive ดังนั้นที่อุณหภูมิ 57°C จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization ของทั้ง normal probe และ mutant probe ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton



### รูปที่ 20 แสดงผลการทำ ASO ของ G6PD Kaiping

รูปA เป็นการ hybridization ของ normal probe โดยมีการปรับอุณหภูมิในการ hybridization ที่อุณหภูมิ 55°C และ 57°C ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 55°C จะปรากฏผล false positive ดังนั้นที่อุณหภูมิ 57°C จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization รูปB เป็นการ hybridization ของ mutant probe โดยมีการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการ hybridization ที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 61°C และ 57°C ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 61°C จะปรากฏผลลบลง (false negative) เกิดขึ้น ดังนั้นที่อุณหภูมิ 57°C จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization สำหรับ mutant probe ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping

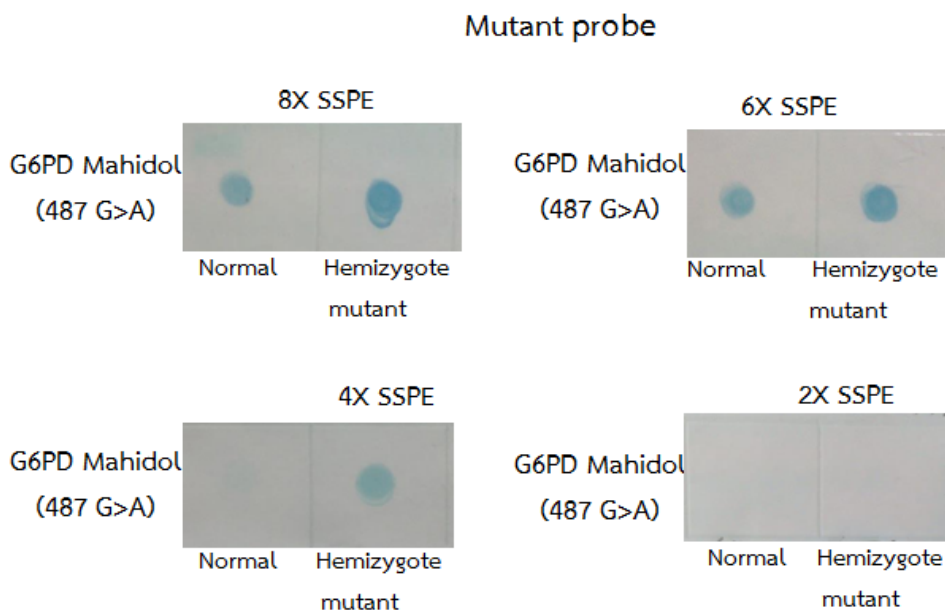
### ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิของ probe ที่เหมาะสมต่อชนิดการกลายพันธุ์

ชนิดของ probe	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	ชนิดของ probe	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)
Mahidol N	65	Canton N	57
Mahidol MT	47	Canton MT	57
Viangchan N	44	Kaiping N	57
Viangchan MT	47	Kaiping MT	57

\*หมายเหตุ N แทน normal probe และ MT แทน mutant probe

#### 4.3.2.2 ความเข้มข้นของเกลือใน buffer (Saline-Sodium-Phosphate-EDTA หรือ SSPE)

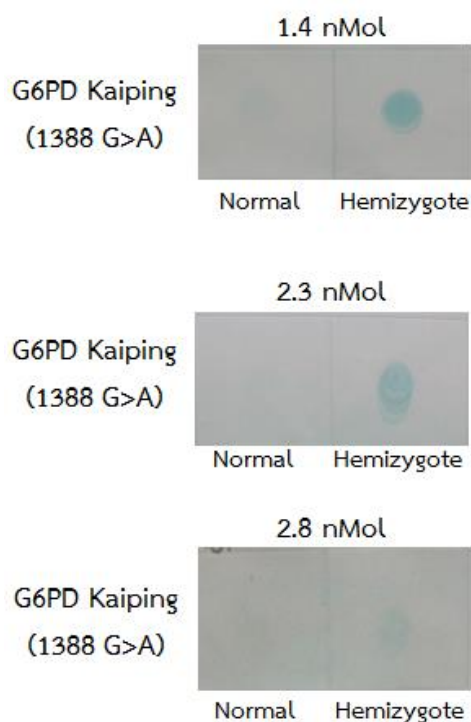
จากการทดลองตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ชนิด G6PD Mahidol ด้วยวิธี ASO กับ mutation probe โดยเจือจางเกลือใน buffer ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8X SSPE, 6X SSPE, 4X SSPE และ 2X SSPE ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือใน buffer 8XSSPE และ 6XSSPE ปรากฏผล false positive และที่ความเข้มข้น 2X SSPE ไม่ปรากฏผลการทดลองใดๆ ดังนั้นที่ความเข้มข้นของเกลือใน buffer 4X SSPE เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization จึงใช้ความเข้มข้นนี้กับทุกๆ การกลายพันธุ์ (รูปที่ 21)



**รูปที่ 21** แสดงผลการทำ ASO ของ mutant probe Mahidol ที่เจือจางความเข้มข้นของเกลือ ใน buffer 8X SSPE, 6XSSPE, 4X SSPE และ 2X SSPE ตามลำดับ พบว่า ที่ความเข้มข้น 4X SSPE เป็นความเข้มข้นของเกลือใน buffer ที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization

#### 4.3.2.3 ปริมาณของ probe ที่ใช้ในการ hybridization

จากการตรวจสอบการละลายพันธุของยีน *G6PD* ชนิด *G6PD Kaiping* ด้วยวิธี ASO กับ mutant probe โดยเจือจางปริมาณเนื้อสารของ probe ในการทำ hybridization ที่ปริมาณเนื้อสาร ตั้งแต่ 1.4 nmol, 2.3 nmol และ 2.8 nmol ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าปริมาณเนื้อสารของ probe ทั้งหมดสามารถตรวจสอบการละลายพันธุได้และให้ผลปรากฏสีฟ้า แต่ที่ปริมาณเนื้อสาร 1.4 nmol ให้ผลปรากฏที่จางซึ่งยากต่อการอ่านและแปลผลการทดลอง จึงเลือกใช้ปริมาณเนื้อสารที่น้อยที่สุดที่สามารถแปลผลได้ง่าย หรือ 2.3 nmol เป็นปริมาณเนื้อสารที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization **รูปที่ 22**



**รูปที่ 22** แสดงผลการทำ ASO ของ mutant probe Kaiping

ที่ปริมาณเนื้อสารของ probe 1.4 nmol, 2.3 nmol และ 2.8 nmol ตามลำดับ พบว่าที่ปริมาณ 2.3 nmol เป็นปริมาณเนื้อสารของ probe ที่เหมาะสมที่สุดในการทำ hybridization

#### 4.3.2.4 ปริมาณของ PCR product ที่ต้องการตรวจสอบ

เมื่อเจือจางปริมาณของ PCR product ตั้งแต่ 25, 50, 100, 200, และ 370 ng พบว่าปริมาณที่เหมาะสมในการ hybridization และให้ผลปรากฏชัดเจนคือ 200 ng (**รูปที่ 23**)

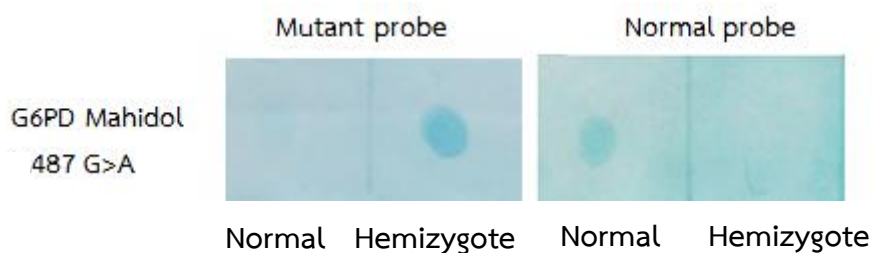
PCR product (ng)      370                  200                  100                  50                  25



**รูปที่ 23** แสดงผลการทำ ASO โดยเจือจาง PCR product ให้มีปริมาณ PCR product ตั้งแต่ 25 ng ถึง 370 ng

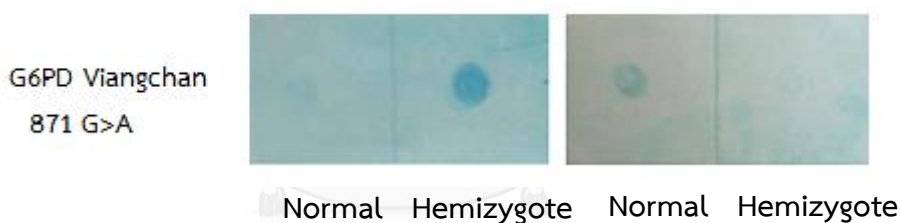
### 4.3.3 ผลการตรวจผลการตรวจการกลายพันธุ์ด้วยวิธี ASO

เมื่อนำ PCR product มาตรวจสอบการกลายพันธุ์แต่ละชนิดด้วยวิธี ASO ให้ผลการทดลองดัง รูปที่ 24-31 หรือให้ผลดังตารางที่ 11 และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธี PCR-RFLP สรุปได้ดังตารางที่ 12



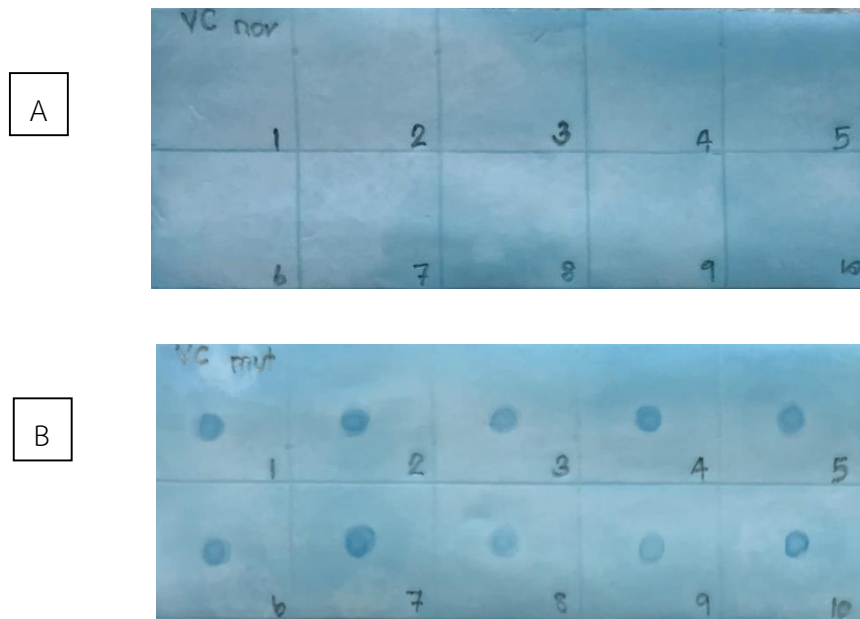
รูปที่ 24 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol ด้วยวิธี ASO

โดยตัวอย่างปกติ (GD225) (normal) จะปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ normal probe (N) ส่วนตัวอย่างที่กลายพันธุ์แบบ G6PD Mahidol (hemizygote) (GD196) จะพบจุดสีฟ้าปรากฏขึ้นเมื่อใส่ mutant probe (MT)



รูปที่ 25 แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan ด้วยวิธี ASO

โดยตัวอย่างปกติ (GD274) (normal) จะปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ normal probe (N) ส่วนตัวอย่างที่กลายพันธุ์แบบ G6PD Viangchan (hemizygote) (GD225) จะพบจุดสีฟ้าปรากฏขึ้นเมื่อใส่ mutant probe (MT)



**รูปที่ 26** แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Viangchan ด้วยวิธี ASO

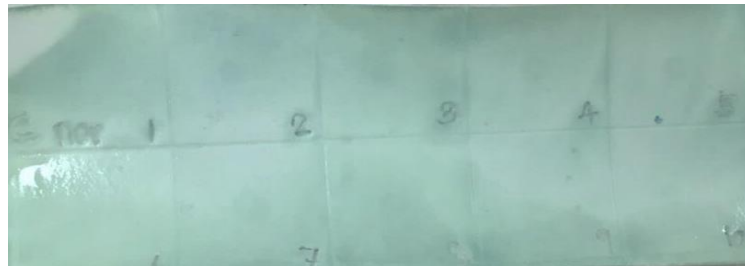
โดยตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย mutagenic primer ที่ถูกออกแบบให้มีตำแหน่งกลายพันธุ์ชนิด Viangchan รูป A เป็นตัวอย่างปกติ (normal) จะไม่ปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ normal probe (N) ส่วนรูป B เป็นตัวอย่างที่กลายพันธุ์แบบ G6PD Viangchan จะพบจุดสีฟ้าปรากฏขึ้นเมื่อใส่ mutant probe (MT)



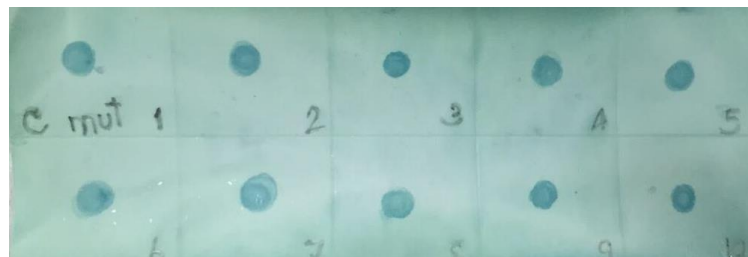
**รูปที่ 27** แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton ด้วยวิธี ASO

โดยตัวอย่างปกติ (GD196) (normal) จะปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ normal probe (N) ส่วนตัวอย่างที่กลายพันธุ์แบบ G6PD Canton (hemizygote) (S181) จะพบจุดสีฟ้าปรากฏขึ้นเมื่อใส่ mutant probe (MT)

A

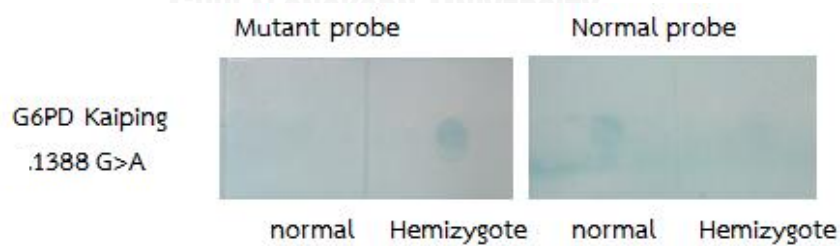


B



**รูปที่ 28** แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Canton ด้วยวิธี ASO

โดยตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย mutagenic primer ที่ถูกออกแบบให้มีตำแหน่งกลายพันธุ์ชนิด Canton รูป A เป็นตัวอย่างปกติ (normal) จะไม่ปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ normal probe (N) ส่วนรูป B เป็นตัวอย่างที่กลายพันธุ์แบบ G6PD Canton จะพบจุดสีฟ้าปรากฏขึ้นเมื่อใส่ mutant probe (MT)



**รูปที่ 29** แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping ด้วยวิธี ASO

โดยตัวอย่างปกติ (normal) (GD196) จะปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ normal probe (N) ส่วนตัวอย่างที่กลายพันธุ์แบบ G6PD Kaiping (hemizygote) (DG274) จะพบจุดสีฟ้าปรากฏขึ้นเมื่อใส่ mutant probe (MT)

A



B

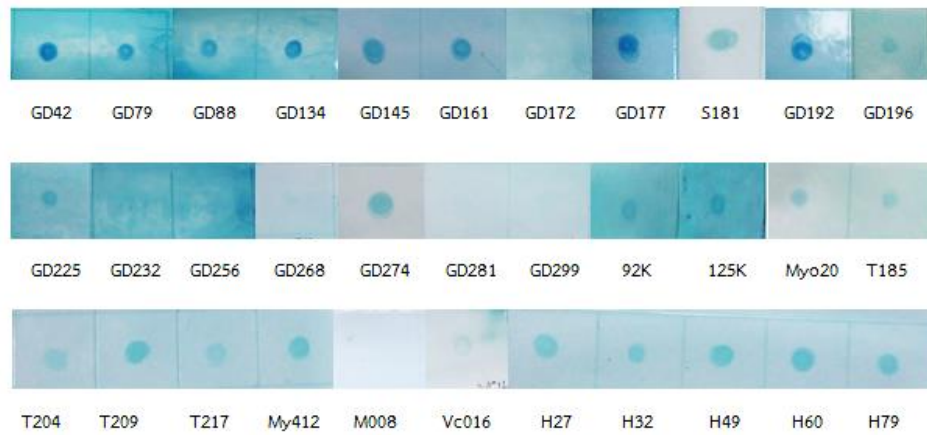


**รูปที่ 30** แสดงผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Kaiping ด้วยวิธี ASO

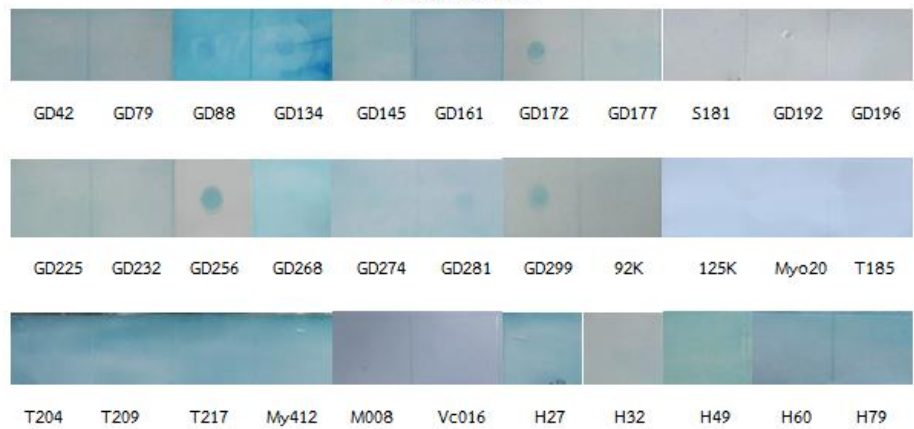
โดยตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่ถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย mutagenic primer ที่ถูกออกแบบมาให้มีตำแหน่งกลายพันธุ์ชนิด Kaiping รูป A เป็นตัวอย่างปกติ (normal) จะไม่ปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ mutant probe (N) ส่วนรูป B เป็นตัวอย่างที่กลายพันธุ์แบบ G6PD Kaiping จะพบจุดสีฟ้าปรากฏขึ้นเมื่อใส่ mutant probe (MT)



Mahidol  
normal probe



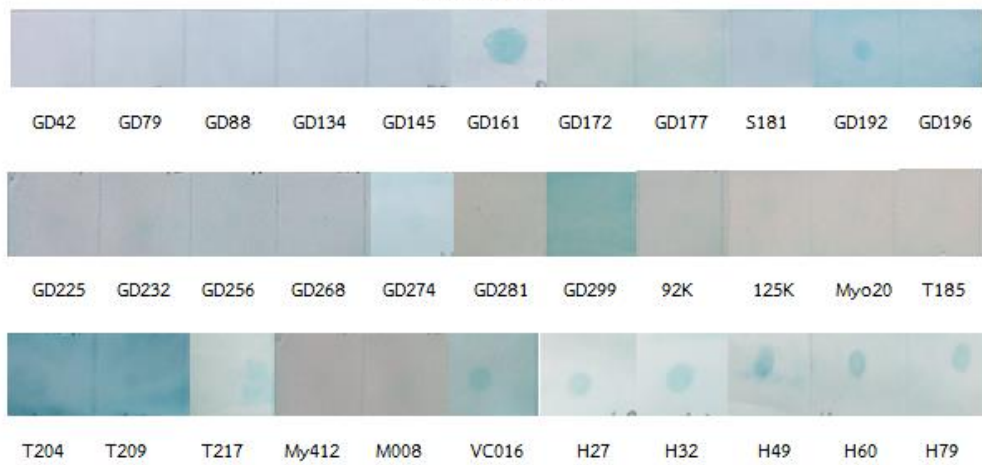
Mahidol  
mutant probe



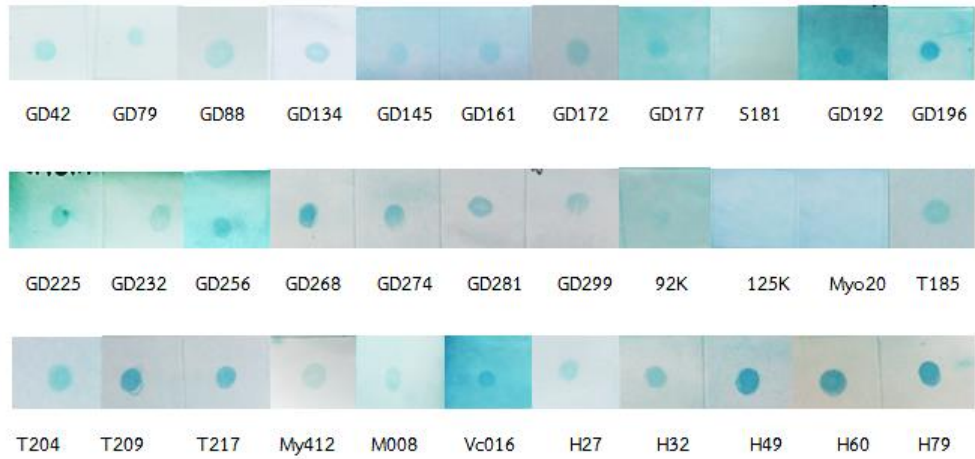
Viangchan  
normal probe



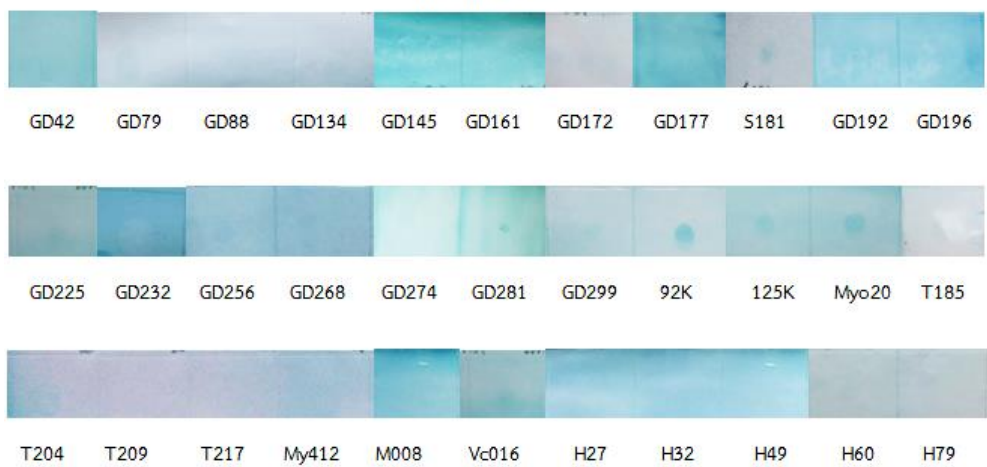
Viangchan  
mutant probe



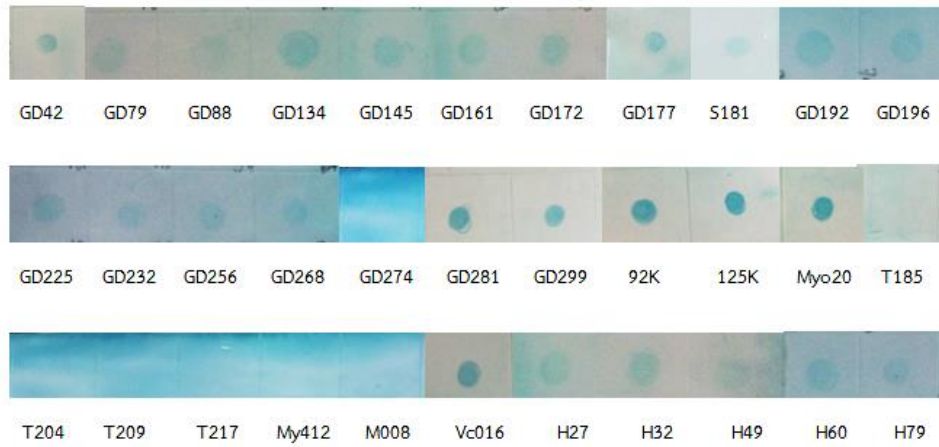
Canton  
normal probe



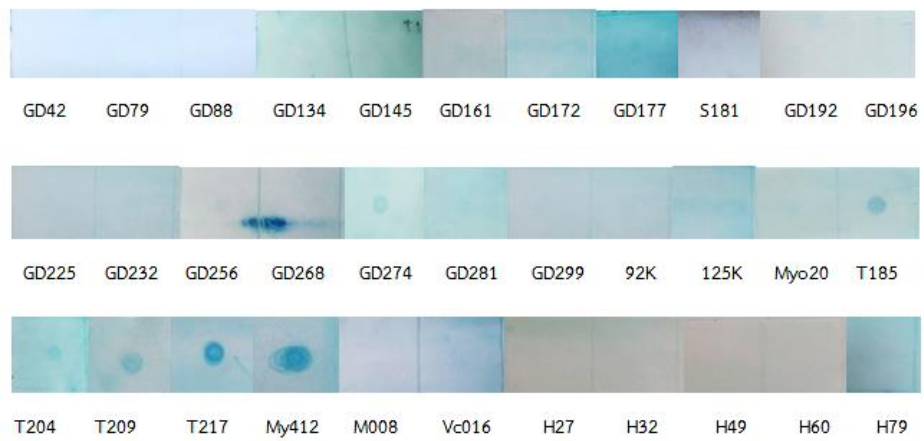
Canton  
mutant probe

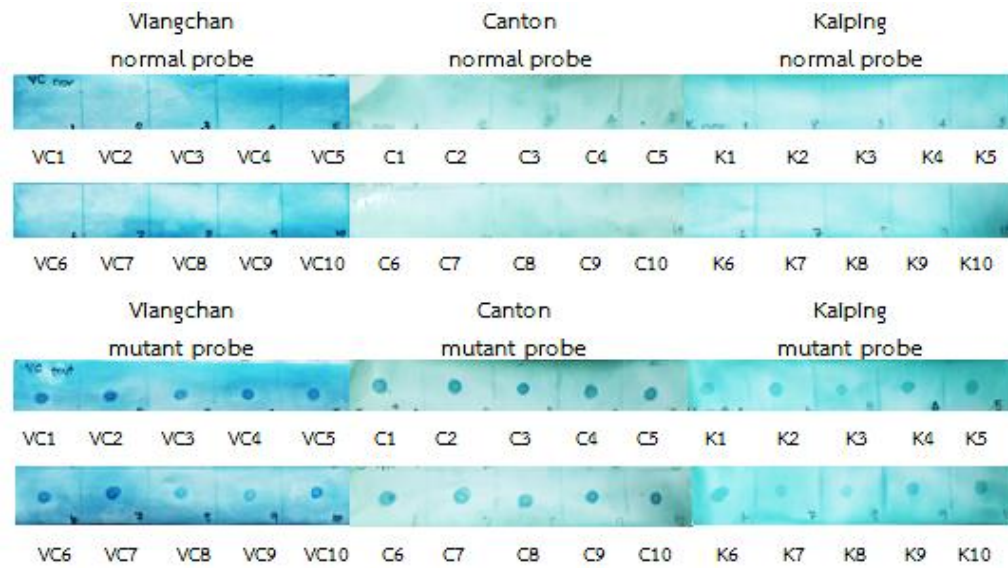


Kaiping  
normal probe



Kaiping  
mutant probe





รูปที่ 31 แสดงตัวอย่างผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน G6PD กับ probe ชนิดต่างๆ โดยตัวอย่างปกติ (normal) จะปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ normal probe (N) และตัวอย่างที่กลายพันธุ์ จะปรากฏจุดสีฟ้าเมื่อใส่ mutant probe (M)

ตารางที่ 11 แสดงสรุปตัวอย่างผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน G6PD กับ probe ชนิดต่างๆ

No	ID	Type of Mutation	G6PD Mahidol		G6PD Viangchan		G6PD Canton		G6PD Kaiping	
			N	M	N	M	N	M	N	M
1	33	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
2	34	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
3	35	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
4	36	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
5	37	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
6	38	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
7	39	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
8	40	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
9	41	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
10	42	Mahidol	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
11	43	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
12	44	Normal	✓	✗	✓	✓	✓	✗	✓	✗
13	45	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
14	46	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗
15	47	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
16	48	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
17	49	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
18	50	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
19	51	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
20	52	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
21	53	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
22	54	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
23	55	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
24	56	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
25	58	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
26	60	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
27	61	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
28	62	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
29	63	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
30	64	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
31	65	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
32	66	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
33	67	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
34	69	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗

35	70	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
36	71	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
37	72	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
38	74	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
39	75	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
40	76	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
41	77	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
42	78	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
43	79	Mahidol	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
44	80	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
45	81	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
46	82	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
47	86	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
48	87	Normal	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗
49	88	Mahidol	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
50	89	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
51	91	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
52	92	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
53	95	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
54	96	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
55	97	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
56	98	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
57	99	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
58	100	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
59	101	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
60	102	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
61	103	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
62	104	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
63	105	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
64	106	Normal	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗
65	107	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
66	108	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
67	109	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
68	110	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
69	111	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
70	112	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
71	113	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗

72	114	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
73	115	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
74	116	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
75	117	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
76	118	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
77	119	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
78	120	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
79	121	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
80	122	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
81	123	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
82	124	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
83	125	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
84	126	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
85	127	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
86	128	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
87	129	Normal	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
88	130	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
89	131	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
90	132	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
91	133	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
92	134	Mahidol	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
93	137	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
94	138	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
95	139	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
96	140	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
97	141	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
98	142	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
99	143	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
100	144	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
101	145	Mahidol	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
102	146	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
103	147	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
104	148	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
105	149	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
106	150	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
107	151	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
108	152	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗



109	153	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
110	154	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
111	155	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
112	156	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
113	157	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
114	158	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
115	160	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
116	161	Viangchan	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗
117	162	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
118	163	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
119	165	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗
120	166	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
121	167	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
122	172	Mahidol	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
123	177	Mahidol	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
124	181	Canton	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✗
125	192	Viangchan	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗
126	193	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
127	194	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
128	195	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
129	196	Mahidol	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
130	197	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
131	198	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
132	199	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
133	200	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
134	201	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
135	202	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
136	203	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
137	205	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
138	206	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
139	207	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
140	208	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
141	209	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
142	211	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
143	212	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
144	213	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
145	216	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
146	222	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗

147	225	Viangchan	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗
148	232	Mahidol	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
149	256	Mahidol	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
150	268	Mahidol	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
151	274	Kaiping	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✓
152	281	Mahidol	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
153	299	Mahidol	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✗
154	92K	Canton (Heterozygous)	✓	✗	✓	✗	✓	✓	✓	✗
155	125K	Canton (Heterozygous)	✓	✗	✓	✗	✓	✓	✓	✗
156	Myo20	Canton	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✗
157	T185	Kaiping	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✓
158	T204	Kaiping	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✓
159	T209	Kaiping	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✓
160	T217	Kaiping	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✓
161	My412	Kaiping	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✓
162	M008	Mahidol	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗
163	VC016	Viangchan	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗
164	H3	Normal	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
165	H27	Viangchan	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗
166	H32	Viangchan	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗
167	H49	Viangchan	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗
168	H60	Viangchan	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗
169	H79	Viangchan	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✓	✗
170	VC1	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
171	VC2	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
172	VC3	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
173	VC4	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
174	VC5	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND

175	VC6	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
176	VC7	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
177	VC8	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
178	VC9	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
179	VC10	Viangchan	ND	ND	✗	✓	ND	ND	ND	ND
180	C1	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
181	C2	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
182	C3	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
183	C4	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
184	C5	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
185	C6	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
186	C7	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
187	C8	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
188	C9	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
189	C10	Canton	ND	ND	ND	ND	✗	✓	ND	ND
190	K1	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
191	K2	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
192	K3	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
193	K4	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
194	K5	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
195	K6	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
196	K7	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
197	K8	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
198	K9	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓
199	K10	Kaiping	ND	ND	ND	ND	ND	ND	✗	✓

- หมายเหตุ N= normal probe, M= mutant probe และ ND = No data

บริเวณที่ไฮไลต์สีแดงคือ ตัวอย่างที่ Fail to detect

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบหาการกลายพันธุ์ระหว่างวิธี PCR-RFLP กับวิธี ASO

Type of mutation	PCR-RFLP method		ASO method		Fail to detect
	Normal	Mutation	Normal	Mutation	
G6PD Viangchan	180	19	159	18	22
Remark of G6PD Viangchan detection: False negative สำหรับ normal probe 20 cases, false positive สำหรับ mutant probe 1 case, false negative สำหรับ mutant probe 1 case					
G6PD Canton	185	14	172	14	13
Remark of G6PD Canton detection: False negative สำหรับ normal probe 13 cases					
G6PD Kaiping	183	16	180	16	3
Remark of G6PD Canton detection: False negative สำหรับ normal probe 3 cases					
G6PD Mahidol	185	14	184	4	11
Remark of G6PD Mahidol detection: False negative สำหรับ mutant probe 7 cases False positive สำหรับ normal probe 8 cases โดยตัวอย่างที่เป็นทั้ง false negative สำหรับ mutant probe และ False positive สำหรับ normal probe มีทั้งหมด 4 cases					

#### 4.3.4 ประสิทธิภาพของวิธี ASO

จากการศึกษาการตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี ASO สามารถสรุปประสิทธิภาพของวิธี ASO ได้ผลดัง ตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงประสิทธิภาพการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของวิธี ASO

หัวข้อที่ศึกษา	วิธี ASO
ปริมาณ DNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้	25 ng
ปริมาณ DNA ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบ	200 ng
ปริมาณ probe ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้	1.4 nmol
ปริมาณ probe ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบ	2.3 nmol
เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ต้องใช้	×
ระยะเวลาที่ใช้ตรวจสอบ (ต่อหนึ่งชนิดของการกลายพันธุ์)	6 ชม.
ความสามารถในการตรวจสอบการกลายพันธุ์หลายชนิดในเวลาเดียวกัน	✓

#### 4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการคำนวณหาค่า sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV) ของการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แต่ละชนิดสามารถทำได้จากการคำนวณ Diagnostic test evaluation โดยใช้โปรแกรม MedCalc software version 15.2.2 ได้ผลดัง ตารางที่ 14-21

ตารางที่ 14 แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Mahidol Mutant probe

Population	Mutant sample	Normal sample	Total
Test outcome positive	TP = 7	FP = 1	PPV (TP / TP+FP) = 87.50%
Test outcome negative	FN = 7	TN = 184	NPV (TN /TN+FN) = 96.34%
	Sensitivity (TP/TP+FN)= 50.00%	Specificity (TN/FP+TN)= 99.46%	

True positive (TP), false positive (FP), false negative (FN), true negative (TN), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV)

ตารางที่ 15 แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Mahidol

Normal probe

Population	Normal sample	Mutant sample	Total
Test outcome positive	TP = 185	FP = 7	PPV (TP / TP+FP) = 96.35%
Test outcome negative	FN = 0	TN = 7	NPV (TN /TN+FN) = 100%
	Sensitivity (TP/TP+FN)=100%	Specificity (TN/FP+TN) = 50.00%	

ตารางที่ 16 แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Viangchan

Mutant probe

Population	Mutant sample	Normal sample	Total
Test outcome positive	TP = 18	FP = 1	PPV (TP / TP+FP) = 94.74%
Test outcome negative	FN = 1	TN = 179	NPV (TN /TN+FN) = 99.44%
	Sensitivity (TP/TP+FN)= 94.74%	Specificity (TN/FP+TN)= 99.44%	

ตารางที่ 17 แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Viangchan

Normal probe

Population	Normal sample	Mutant sample	Total
Test outcome positive	TP = 160	FP = 1	PPV (TP / TP+FP) = 99.38%
Test outcome negative	FN = 20	TN = 18	NPV (TN /TN+FN) = 47.37%
	Sensitivity (TP/TP+FN)= 88.89%	Specificity (TN/FP+TN)= 94.74%	

ตารางที่ 18 แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Canton

Mutant probe

Population	Mutant sample	Normal sample	Total
Test outcome positive	TP = 14	FP = 0	PPV (TP / TP+FP) = 100%
Test outcome negative	FN = 0	TN = 185	NPV (TN / TN+FN) = 100%
	Sensitivity (TP/TP+FN)= 100%	Specificity (TN/FP+TN)= 100%	

ตารางที่ 19 แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Canton

Normal probe

Population	Normal sample	Mutant sample	Total
Test outcome positive	TP = 172*	FP = 0	PPV (TP / TP+FP) = 100%
Test outcome negative	FN = 15**	TN = 12***	NPV (TN / TN+FN) = 44.44%
	Sensitivity (TP/TP+FN)= 91.98%	Specificity (TN/FP+TN)= 100%	

\* มี 1 ตัวอย่าง heterozygous Canton ที่ขึ้นใน Canton normal probe

\*\* มี 1 ตัวอย่าง heterozygous Canton ที่ไม่ขึ้นใน Canton normal probe

\*\*\* หักลบตัวอย่าง heterozygous Canton 2 ตัวอย่าง

ตารางที่ 20 แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Kaiping

Mutant probe

Population	Mutant sample	Normal sample	Total
Test outcome positive	TP = 16	FP = 0	PPV (TP / TP+FP) = 100%
Test outcome negative	FN = 0	TN = 183	NPV (TN / TN+FN) = 100%
	Sensitivity (TP/TP+FN)= 100%	Specificity (TN/FP+TN)= 100%	

ตารางที่ 21 แสดงการคำนวณค่า sensitivity และค่า specificity ของการตรวจด้วย Kaiping

Normal probe

Population	Normal sample	Mutant sample	Total
Test outcome positive	TP = 180	FP = 0	PPV (TP / TP+FP) = 100%
Test outcome negative	FN = 3	TN = 16	NPV (TN / TN+FN) = 84.21%
	Sensitivity (TP/TP+FN)= 98.36%	Specificity (TN/FP+TN)= 100%	





## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD เป็นภาวะที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่แขนข้างยาว ตำแหน่ง q28 บนโครโมโซมเพศ X ซึ่งพบความชุกมากในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทยด้วย การตรวจสอบหาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD สามารถทำได้หลายวิธี และวิธีที่เป็นมาตรฐานตามองค์การอนามัยโลกคือวิธีตรวจวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ (29) แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ในผู้ป่วย heterozygote หรือในกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกมาก ร่างกายจึงสร้างเม็ดเลือดแดงใหม่ขึ้นมาทดแทน จึงทำให้มีปริมาณ reticulocyte ในเลือดสูงกว่าปกติ ซึ่งมีผลให้ค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ใกล้เคียงกับคนปกติ อาจเป็นเหตุให้การแปลผลการตรวจสอบผิดพลาด (false negative) ดังนั้นการตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ในกลุ่มประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่พบความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G 6-PD ปริมาณสูง (10) ด้วยการตรวจเฉพาะค่ากัมมันตภาพเอนไซม์เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ จึงควรตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ร่วมด้วย เพื่อยืนยันผลการตรวจทั้งในระดับโปรตีนและพันธุกรรม

ปัจจุบันเทคนิคการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* มีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อจำกัดในการคัดกรองผู้ป่วย อาทิเช่น ราคาแพง ใช้เวลาในการตรวจสอบนาน และไม่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์หลายชนิดพร้อมกันได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิค ASO สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย คือ G6PD Mahidol (487G>A) ซึ่งไม่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ G6PD Viangchan (871G>A), G6PD Canton (1376G>T) และ G6PD Kaiping (1388G>A) ด้วยเทคนิค ASO โดยใช้หลักการตรึง PCR product ลงบน membrane แล้วนำ probe จำเพาะต่อชนิดการกลายพันธุ์ที่ติดฉลากด้วย biotin มา hybridize และตรวจปฏิกิริยาการเกิดสีของ product ที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ที่ติดฉลากด้วย streptavidin-HRP ซึ่งจับจำเพาะกับ biotin ทำให้เทคนิค ASO สามารถวินิจฉัยและระบุชนิดของการกลายพันธุ์ได้

ทั้งนี้การพัฒนาเทคนิค ASO จะสำเร็จหรือไม่ขึ้นกับหลายปัจจัย และจะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจการกลายพันธุ์ได้หรือไม่นั้น พึงพิจารณาค่า sensitivity, specificity, PPV, NPV ของ probe แต่ละชนิด ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิค ASO ซึ่งสรุปได้ดังต่อไปนี้

## 5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการ hybridization

จากการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด *G6PD Mahidol* (487G>A), *G6PD Viangchan* (871 G>A), *G6PD Canton* (1376 G>A) และ *G6PD Kaiping* (1388 G>A) ด้วยเทคนิค ASO พบว่ามีปัจจัยสำคัญหลายประการที่ส่งผลต่อการตรวจสอบ ดังต่อไปนี้

### 5.1.1 อุณหภูมิในการ hybridization

Probe ที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าจับกับ target DNA ที่เฉพาะเจาะจง โดยอาศัยหลักการคำนวณค่า  $T_m$  (อุณหภูมิที่ทำให้ร้อยละ 50 ของ double strand DNA กลายเป็น single strand) และลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ probe เข้า hybridize กับ target DNA ได้ (62) และด้วย probe แต่ละชนิดที่ใช้มีความยาวและ %GC ที่แตกต่างกัน จึงทำให้อุณหภูมิที่ใช้ต่างกัน แต่ทั้งนี้ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้พยายามออกแบบให้ probe ทุกชนิดมีค่า  $T_m$  ที่ใกล้เคียงกัน เพื่อให้สามารถใช้อุณหภูมิในการ hybridization ได้เท่ากัน แต่เมื่อทำการทดสอบจริงกลับจำเป็นต้องปรับอุณหภูมิให้ต่างกันเพื่อให้สามารถแปลผลได้อย่างถูกต้อง

### 5.1.2 ปริมาณของ probe

ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ด้วยการพัฒนาเทคนิค ASO นั้น ปริมาณของ probe เป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่ง เนื่องมาจากปริมาณของ probe ที่เพิ่มขึ้นจะสามารถจับกับ target DNA ได้มากยิ่งขึ้น โดยจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายของ nucleotide แต่ในทางกลับกันหากปริมาณของ probe ที่เหลือจากการจับกับ target DNA มีมากเกินไปจะสามารถไปจับกับ nylon membrane ได้ โดยอาศัยประจุลบของหมู่ฟอสเฟต ( $PO_4^{3-}$ ) ใน nucleotide เข้าจับกับประจุบวกของ หมู่ amine บน positive charge nylon membrane ทำให้เกิดสีของพื้นหลังส่งผลให้การแปลผลยากขึ้นหรือผิดพลาดได้ (false positive) ในทางกลับกันหากปริมาณของ probe น้อยเกินไปจะส่งผลให้ probe ไม่เพียงพอที่จะจับกับ target DNA ทำให้ไม่เกิดจุดสีฟ้าปรากฏ เกิดเป็น false negative ดังนั้นการทดสอบปริมาณของ probe ที่เหมาะสมต่อการทำ hybridization จึงนับเป็นสิ่งสำคัญ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบหาปริมาณของ probe ที่ความเข้มข้น 1.4 nMol, 2.3 nMol และ 2.8 nMol ตามลำดับ พบว่าที่ปริมาณของ probe ตั้งแต่ 1.4 nMol เป็นปริมาณที่สามารถใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้ แต่เนื่องจากความเข้มของจุดสีฟ้าในผลการทดลอง ที่ปรากฏค่อนข้างจาง ทำให้ยากต่อการอ่านและแปลผล จึงเลือกปริมาณของ probe ที่ 2.3 nMol ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยที่สุดที่ให้ผลชัดเจนและถูกต้อง ซึ่งปริมาณดังกล่าวมีปริมาณที่มากกว่าเมื่อเทียบกับ

การศึกษาก่อนหน้านี้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ด้วยวิธี reverse dot blot (RDB) ที่ใช้ปริมาณของ probe ที่ระดับปริมาณตั้งแต่ 0.25 pmol – 10 pmol (63, 64) เพราะในการทำ RDB นั้นจะนำ probe หยดลงบน membrane ก่อนแล้วจึงนำ PCR product มา hybridization แต่วิธี Dot blot จะต้องผสม probe ลงใน hybridization buffer ภายหลังจากหยด PCR product ลงบน membrane จึงทำให้ใช้ปริมาณ probe มากกว่า

ทั้งนี้เมื่อคิดเปรียบเทียบปริมาตรของ probe ที่ใช้ในการทดลองที่ระดับปริมาณ probe ต่างๆ ต่อจำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดลอง พบว่าที่ปริมาณของ probe 2.3 nMol ด้วยปริมาตรของ probe 2.5 ml สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้ 110 ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับปริมาณของ probe 2.8 nMol ที่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้ 96 ตัวอย่าง

### 5.1.3 ปริมาณของ target DNA

ปริมาณของ target DNA เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* เมื่อปริมาณของ target DNA เพิ่มมากขึ้นจะสามารถปรากฏจุดในผลการตรวจสอบได้ชัดเจนขึ้น แต่อย่างไรก็ตามหากมีตัวอย่าง DNA น้อยอาจไม่สามารถทำ ASO ได้ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบหาปริมาณที่น้อยที่สุดที่เหมาะสมและสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ได้ โดยความปริมาณของ target DNA ที่ใช้ คือประมาณ 200 ng ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ผลการตรวจสอบปรากฏชัดเจนสามารถแปลผลได้ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานก่อนหน้านี้ที่ใช้ปริมาณของ target DNA ในการทำ dot blot 66 ng (65)

### 5.1.4 ความเข้มข้นของเกลือใน buffer (saline-sodium phosphate-EDTA หรือ SSPE)

SSPE เป็น hybridization buffer ที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการจับกันระหว่าง probe และ target DNA (high ionic strength) โดยประจุบวกของเกลือ ( $\text{Na}^+$ ) จะเข้าไปจับกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ใน nucleotide ทำให้ลดการผลักรันของประจุลบของหมู่ฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ระหว่างสายของ DNA target และ probe ที่ออกแบบมาให้มีลำดับ nucleotide เข้าคู่กับ DNA target ส่งผลให้ probe สามารถจับกับ DNA target ได้แน่นมากยิ่งขึ้น หากความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทดสอบและความคมชัดได้มากขึ้นด้วย (เพิ่ม sensitivity) ในทางกลับกันหากมีความเข้มข้นของเกลือใน buffer มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดผลการบวกหลวง (false positive) แต่หากความเข้มข้นของเกลือลดลงจะมีผลต่อ  $T_m$  ในการ hybridization ของการกลายพันธุ์แต่ละชนิดและส่งผลให้การจับกันของ probe และ target DNA ลดลงด้วยเกิดเป็นผลลบหลวง (false negative) (66) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของเกลือใน buffer ที่ความเข้มข้น 8X SSPE,

6XSSPE, 4X SSPE และ 2X SSPE ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของเกลือใน buffer 4X SSPE เป็นความเข้มข้นที่ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ พบการรายงานว่าทำการศึกษาที่ความเข้มข้นของเกลือ 5X SSPE (63)

## 5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลจากการคำนวณค่า sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) และ negative predictive value (NPV)

การวิเคราะห์ข้อมูลจากการคำนวณ diagnostic test evaluation พบว่าค่า sensitivity, specificity, PPV และ NPV ของ probe ชนิด Canton mutant และ Kaiping mutant มีค่าร้อยละ 100 ทั้งสิ้น ส่วน probe ชนิดอื่นๆ มีค่า sensitivity, specificity, PPV และ NPV ระหว่างร้อยละ 88.89-99.46 ยกเว้น Mahidol normal probe ที่มีค่า specificity ร้อยละ 50 และ Mahidol mutant probe ที่มีค่า sensitivity ร้อยละ 50 ทั้งนี้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้ probe คนละลำดับเบสกับการวิจัยนี้แต่สามารถให้ค่า sensitivity ร้อยละ 100 และ specificity ร้อยละ 98 (67) ยกเว้นการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol ที่ยังไม่เคยมีการออกแบบและพัฒนา probe มาก่อน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาวินิจฉัยนี้ยังไม่สามารถออกแบบ mutant probe และ normal probe ให้มีค่า sensitivity และ specificity ร้อยละ 100 ได้ ที่จะสามารถนำไปใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้ ยังคงต้องพัฒนาปรับแก้ไขลำดับเบสให้จำเพาะต่อไป

## 5.3 ข้อจำกัดและแนวทางแก้ไขของการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน G6PD ด้วยวิธี ASO

### 5.3.1 ความสามารถในการตรวจสอบได้พร้อมกัน

จากผลการวิจัยพบว่า G6PD Canton และ G6PD Kaiping สามารถตรวจสอบไปพร้อมกันได้ เพราะ probe ทั้ง mutant และ normal ใช้อุณหภูมิ 57 °C ในขั้นตอน hybridization เหมือนกัน ส่วน G6PD Mahidol และ G6PD Viangchan สามารถตรวจสอบไปพร้อมกันได้เฉพาะ Mahidol mutant probe และ Viangchan mutant probe เพราะใช้อุณหภูมิ 47 °C เหมือนกัน ส่วน Mahidol normal probe และ Viangchan normal probe ไม่สามารถตรวจสอบพร้อมกันได้ เพราะใช้คนละอุณหภูมิ ดังนั้นหากจะตรวจสอบการกลายพันธุ์ทั้งสี่ชนิด จะต้องเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 4 ครั้งจึงจะแล้วเสร็จ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าควรปรับแก้ไขการออกแบบ probe ของการกลายพันธุ์ชนิด G6PD Mahidol และ G6PD Viangchan ใหม่ หรือ ปรับความเข้มข้นของเกลือใน buffer เพื่อให้สามารถทำไปพร้อมกับ G6PD Canton และ G6PD Kaiping ได้

### 5.3.2 ความแม่นยำในการตรวจสอบ

จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของ probe แต่ละเส้น พบว่า probe แต่ละชนิดมีความแม่นยำในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* แตกต่างกัน ดังนี้

- Mahidol mutant probe มีความไวในการทดสอบต่ำเพียงร้อยละ 50 หรือยังไม่สามารถตรวจหาตัวอย่างที่กลายพันธุ์ Mahidol ได้ทั้งหมด
- Mahidol normal probe มีความจำเพาะในการทดสอบต่ำเพียงร้อยละ 50 หรือยังไม่สามารถคัดแยกตัวอย่างที่กลายพันธุ์ Mahidol ออกจากตัวอย่างปกติได้ทั้งหมด
- Viangchan mutant probe มีค่า sensitivity, specificity, PPV, NPV ยังไม่เป็นร้อยละ 100 ยังมีตัวอย่าง false negative และ false positive แม้ว่าจะยืนยันลำดับเบสในตัวอย่างดังกล่าวด้วยวิธี sequencing แล้วก็ตาม
- Viangchan normal probe มีค่า NPV เพียงร้อยละ 47.37 หรือยังพบการจำแนกตัวอย่างที่ไม่กลายพันธุ์ชนิด Viangchan ปะปนกับตัวอย่างที่กลายพันธุ์อยู่
- Canton mutant probe มีความไว จำเพาะ คัดแยกตัวอย่างที่กลายพันธุ์ Canton และตัวอย่างปกติได้ดีมาก โดยมีค่า sensitivity, specificity, PPV, NPV ร้อยละ 100
- Canton normal probe มีค่า NPV เพียงร้อยละ 55.56 หรือยังพบการจำแนกตัวอย่างที่ไม่กลายพันธุ์ Canton ปะปนกับตัวอย่างที่กลายพันธุ์อยู่
- Kaiping mutant probe มีความไว จำเพาะ คัดแยกตัวอย่างที่กลายพันธุ์ Kaiping และตัวอย่างปกติได้ดีมาก โดยมีค่า sensitivity, specificity, PPV, NPV ร้อยละ 100
- Kaiping normal probe ยังมีค่า sensitivity และ NPV ที่ไม่เป็นร้อยละร้อย เพราะยังจำแนกตัวอย่างปกติปะปนกับตัวอย่างที่กลายพันธุ์ Kaiping อยู่

แม้ผู้วิจัยจะได้ตรวจการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยวิธี ASO และตรวจลำดับเบสด้วยวิธี sequencing แล้วก็ตาม ก็ยังได้ผลการวิจัยเช่นเดิม ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากลำดับเบสของ probe ที่ยังไม่จำเพาะและแม่นยำมากพอที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจการกลายพันธุ์ ยังคงต้องปรับปรุงให้มีความแม่นยำและความจำเพาะต่อลำดับ nucleotide ของ target DNA ให้มากขึ้น การออกแบบ probe แต่ละชนิดนอกจากจะต้องคำนึงถึงความยาว ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ และ

อุณหภูมิในการ hybridization ของ probe แล้ว ยังต้องคำนึงถึงค่า  $\Delta G$  หรือพลังงานอิสระกิบส์ของ probe ควบคู่ไปด้วย

ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นการพัฒนาเทคนิค Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ที่พบบ่อยในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกลายพันธุ์ชนิด *G6PD Mahidol* ที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* โดยใช้เทคนิค reverse dot blot สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิดต่างๆ ที่พบบ่อยในกลุ่มประชากรจีน (4)

### 5.3.3 ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ

ปัจจุบันทางผู้วิจัยได้คำนวณราคาในการทำการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ด้วยวิธี ASO 1 ตัวอย่างต่อ 1 ชนิดของการกลายพันธุ์อยู่ที่ราคาประมาณ 182 บาท และใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมงนับตั้งแต่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งเมื่อเทียบกับวิธี PCR-RFLP ต่อ 1 ตัวอย่างต่อ 1 ชนิดของการกลายพันธุ์อยู่ที่ราคา 53 บาท ซึ่งราคาถูกกว่าแต่ใช้ระยะเวลาในการทำการทดลองนานกว่าคือประมาณ 1 วัน อย่างไรก็ตามวิธี PCR-RFLP ยังคงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันถึงแม้ว่าจะต้องใช้เวลาในการตรวจสอบมากก็ตาม แม้ว่าวิธี ASO อาจจะเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนในการตรวจสอบสูง แต่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์หลายชนิดจากตัวอย่างจำนวนมากได้พร้อมๆ กันและใช้เวลาในการทดลองที่รวดเร็วกว่า แต่อย่างไรก็ตามการจะเลือกใช้วิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธีใดขึ้นอยู่กับความพร้อมของเครื่องมือและความสะดวกของแต่ละห้องปฏิบัติการ

จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าเทคนิค ASO สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *G6PD* ชนิด Canton และ Kaiping ที่พบบ่อยในประเทศไทยได้พร้อมกัน โดยใช้เวลาเพียง 6 ชั่วโมง ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจการกลายพันธุ์แบบ reverse dot blot (RDB) ได้ในอนาคต

## รายการอ้างอิง

1. Cappellini M, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 2008;371(9606):64-74.
2. อธิธิโสภณกุล อ, สุอร ช. สารออเรนจ์ ทู : สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกอย่างเฉียบพลันในผู้ป่วยภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต-ดีไฮโดรจีเนส. *ขอนแก่นเวชสาร*. 2549;2:176-83.
3. Nuchprayoon I, Louicharoen C, Charoenvej W. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Mon and Burmese of southern Myanmar. *J Hum Genet*. 2008;53(1):48-54.
4. Lu X, Hua L, Zhang T, Li S, Fan X, Peng Q, et al. A reverse dot blot assay for the expanded screening of eleven Chinese G6PD mutations. *Clin Chim Acta*. 2013 Mar 15;418:45-9.
5. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;111:16-24.
6. กาญจนวิทยากุล อ, ชีพสุนทร ชห, editors. ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์กลูโคส 6-ฟอสเฟต ดี ไฮโดรจีเนส และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนจี ซิกพี ดีในชาวกะเหรี่ยง The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 “Pharmacy Profession in Harmony” 2012; Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand.
7. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood*. 1994;84(11):3613-36.
8. Tan I, Whitehead T. Automated fluorometric determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activities in red blood cells. *Clin Chem*. 1969;15:467-78.
9. Seidlein LV, Auburn S, Espino F, Shanks D, Cheng Q, McCarthy J, et al. Review of key knowledge gaps in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection with regard to the safe clinical deployment of 8-aminoquinoline treatment regimens: a workshop report. *Malar J*. 2013;12:112.
10. Li L, Zhou Y, Xiao Q, Yan T, Xu X. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of six common Chinese G6PD mutations and one polymorphism. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;41(1):17-21.

11. Tang T, Huang C, Huang M, Tam K, Yeh C, Tang C. Diverse point mutations result in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) polymorphism in Taiwan. *Blood*. 1992;79:2135-40.
12. Tang T, Huang C, Huang M, Tam K, Yeh C, Tang C. Diagnosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations by DNA amplification and allele-specific oligonucleotide probes. *Acta Haematol*. 1992;88(2-3):92-5.
13. Vaca G, Meraz E. DNA sequencing analysis of several G6PD variants previously defined by PCR-restriction enzyme analysis. *Genet Mol Biol*. 2006;29(1):31-5.
14. Sutcharitchan P, Saiki R, Huisman THJ, Kutlar A, McKie V, Erlich H, et al. Reverse Dot-Blot Detection of the African-American Beta-Thalassemia Mutations. *Blood*. 1995;86(4):1580-5.
15. ปิยะโชคณากุล ส. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2552. 24 p.
16. Peters A, Cornelis J, Noorden V. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2009;57(11):1003-11.
17. Farhud D, Yazdanpanah L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Deficiency Iran *J Public Health*. 2008;37(4):1-18.
18. Alvin Z, Marlene S, Elizabeth J, Per L. Sulfhydryl groups of the erythrocyte membrane and their relation to glycolysis and drug-induced hemolytic anemia. *Clin Invest*. 1974;53(3):805.
19. กาญจนางค์กุล ส. โรคพร่องเอนไซม์ G-6-PD สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี 2012. Available from: [http://www.tsh.or.th/knowledge\\_detail.php?id=29](http://www.tsh.or.th/knowledge_detail.php?id=29).
20. Ambalavanan N, WA. C. Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. Elsevier. 2011:603-7.
21. Clancy R, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J, Abramson S. Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *PNAS*. 1994;91(9):3680-4.



22. Dalooi N, Daneshpajooch M. MOLECULAR BASIS OF G6PD DEFICIENCY:CURRENT STATUS AND ITS PERSPECTIVE. *Acta Med Iran.* 2008;6:167-82.
23. Ali REC, Henry HRM. Perioperative management of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patient: a review of literature. *Anesthesia progress.* 2009;56(3):86-91.
24. Matsuoka H, Nguon C, Kanbe T, Jalloh A, Sato H, Yoshida S, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Cambodia: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common variant in the Cambodian population. *J Hum Genet.* 2005;50(9):468-72.
25. Matsuoka H, Wang J, Hirai M, Arai M, Yoshida S, Kobayashi T, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Myanmar: G6PD Mahidol (487G> A) is the most common variant in the Myanmar population. *J Hum Genet.* 2004;49(10):544-7.
26. Louicharoen C, Patin E, Paul R, Nuchprayoon I, Witoonpanich B, Peerapittayamongkol C, et al. Positively selected G6PD-Mahidol mutation reduces *Plasmodium vivax* density in Southeast Asians. *Science.* 2009;326(5959):1546-9.
27. Ainoon O, Yu Y, Muhriz A, Boo N, Cheong S, Hamidah N. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Malaysian Malays. *Hum Mutat.* 2003;21:101.
28. Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, Kawamoto F, Horie T, Lin K, et al. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. *J Hum Genet.* 2001;108(6):445-9.
29. Nuchprayoon I, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. *Hum Mutat.* 2002;19(2):185.
30. Barlow K. MOSAICISM—Complex Patterns of Inheritance 3 April 2012. Available from: [www.genetics.edu.au](http://www.genetics.edu.au)
31. Willard H, Carrel L. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *PNAS.* 1999;96(13):7364-9.

32. Nkhoma E, Poole C, Vannappagari V, Hall S, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cell Mol Dis.* 2009;42(3):267-78.
33. Masayo K, Sheila G, Lucy V, Shannon WA, Veronica ML, Margaret JA. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP<sup>+</sup> binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Cryst D : Bio Cryst.* 2005;61(5):495-504.
34. Hirono A, Miwa S. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: structure and function of normal and variant enzymes. *Haematologia.* 1992;25(2):85-97.
35. Michael S, Sheila G, Claire E, Lucy V, Margaret J, Richard L. An examination of the role of Asp-177 in the His-Asp catalytic dyad of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: X-ray structure and pH dependence of kinetic parameters of the D177N mutant enzyme. *Biochemistry.* 2000;39(49):15002-11.
36. Mason P, Bautista J, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood reviews.* 2007;21(5):267-83.
37. Phompradit P, Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rueangweerayut R, Hongkaew Y, Yamnuan R, et al. Prevalence and distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Thai and Burmese populations in malaria endemic areas of Thailand. *Malar J.* 2011;10:368.
38. Louicharoen C, Nuchprayoon I. G6PD Viangchan (871G> A) is the most common G6PD-deficient variant in the Cambodian population. *J Hum Genet.* 2005;50(9):448-52.
39. ชาลิสสา ชห, อิศรางค์ นุชประยูร พ.บ. PD. ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และการตรวจวินิจฉัยเพื่อการรักษาโรคมาลาเรียด้วยยาไพรมาควิน. วารสารจุฬาลงกรณ์เวชสาร ปีที่ 58 ฉบับที่ 2 มีนาคม - เมษายน 2557. 2557.
40. Saha S, Saha N, Tay J, Jeyaseelan K, Basair J, Chew S. Molecular characterisation of red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Singapore Chinese. *American journal of hematology.* 1994;47(4):273-7.
41. Bolton E, McCarthy B. A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *PNAS.* 1962;48:1390-7.
42. Sukumar S, Malay M, Colah R, Mohanty D. Molecular basis of G6PD deficiency in India. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;33(2):141-5.

43. Sidhu P, Kaur K, Kumar I, Lata S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in blood donors: screening by micromethaemoglobin reduction test. *Indian J Pathol Microbiol.* 2001;44(1):23-5.
44. Xiu J, Qi X, Shan K, Xie Y, He Y, Wu C, et al. G6PD Gene Mutations in Shui people in Sandu of Guizhou. *J Exp Hematol.* 2005;13(1):147-50.
45. นุชประยูร อ. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: Molecular and Clinical Aspects. บริษัท จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ 2553.
46. Organization WH. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase : report of a WHO Scientific Group 1967.
47. Roh M, Oyet C, Orikiriza P, Wade M, Mwanga-Amumpaire J, Boum Y, et al. Screening for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Using Three Detection Methods: A Cross-Sectional Survey in Southwestern Uganda. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2016;95(5):1094-9.
48. Beutler E. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and glutathione reductase deficiency. *Blood.* 1971;28:553-62.
49. Nadarajan V, Shanmugam H, Sthaneshwar P, Jayarane S, Sultan K, Ang C, et al. Modification to reporting of qualitative fluorescent spot test results improves detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient heterozygote female newborns. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(5):463-70.
50. BREWER GJ TA, ALVING AS. Methaemoglobin reduction test: a new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. *Bull World Health Organ.* 1960;22:633-40.
51. BREWER GJ TA, ALVING AS. The methemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug hemolysis. *JAMA.* 1962;180:386-8.
52. Adu P, Simpong D, Takyi G, Ephraim R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Sickle Cell Trait among Prospective Blood Donors: A Cross-Sectional Study in Berekum, Ghana. *Adv Hematol.* 2016.

53. Nantakomol D, Paul R, Palasuwan A, Day N, White N, Imwong M. Evaluation of the phenotypic test and genetic analysis in the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Malar J.* 2013;12:289.
54. Noorden CV, Vogels I, James J, Tas J. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. *Histochemistry.* 1982;75(4):493-506.
55. Noorden CV, Vogels I. A sensitive cytochemical staining method for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes. II. Further improvements of the staining procedure and some observations with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Br J Haematol.* 1985;60(1):57-63.
56. Randall K, Sean W, Corey H, Henry A. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *PNAS.* 1989;86(16):6230-4.
57. ปิยะโชคณากุล ส. การวิเคราะห์และตรวจสอบดีเอ็นเอที่โคลนได้ในพันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2545. 145-61 p.
58. Lilian T. C. Franc:a EC, Tarso B. L. Kist. A review of DNA sequencing techniques. Cambridge University Press 2002.
59. PCR Clean Up Protocol. Available from: [http://www.bioaspect.com/assets/files/BA-YDF100-\(RBC-Bioscience-product\).pdf](http://www.bioaspect.com/assets/files/BA-YDF100-(RBC-Bioscience-product).pdf).
60. Terry B. analysis of DNA sequences by blotting and hybridization. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1999.
61. AK A. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta paediatrica.* 2007;96(3):338-41.
62. Fisher J, Gusella J, Scoggin C. Molecular hybridization under conditions of high stringency permits cloned DNA segments containing reiterated DNA sequences to be assigned to specific chromosomal locations. *PNAS.* 1984;81.
63. Els S PV, Jean J C, Gert M. Development of reverse dot-blot system for screening of mitochondrial DNA mutations associated with labor hereditary optic atrophy. *Molecular Pathology and Genetics.* 1997;43(1):18-23.
64. Armua-Fernandez M, Nonaka N, Sakurai T, Nakamura S, Gottstein B, Deplazes P, et al. Development of PCR/dot blot assay for specific detection and differentiation of taeniid cestode eggs in canids. *Parasitology international.* 2011;60(1):84-9.

65. Kimura M, Aviv A. Measurement of telomere DNA content by dot blot analysis. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(12):84.
66. Schildkraut C, Lifson S. Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers.* 1965;3:195-208.
67. Baldas V, Tommasini A, Trevisiol C, Berti I, Fasano A, Sblattero D, et al. Development of a novel rapid non-invasive screening test for coeliac disease. *GUT.* 2000;47:628-31.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



COE No. 010/2013

IRB No. 280/56

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
1873 ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4455 ต่อ 14, 15

**เอกสารรับรองการยกเว้นพิจารณาจริยธรรมโครงการวิจัย**

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองการยกเว้นพิจารณาจริยธรรมโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP และ 45CFR 46.101(b)

**ชื่อโครงการ** : การพัฒนาเทคนิคอัลตราซาวด์เชิงฟังก์ชันอัลตราซาวด์เพื่อคัดกรองทารกสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ของยีนจีซิกพีดีชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย

**เลขที่โครงการวิจัย** : -

**ผู้วิจัยหลัก** : นางสาวอรพรรณ เกียรติอมรรัชช

**สังกัดหน่วยงาน** : ภาควิชาชีวเคมี

**เอกสารรับรอง** :

1. โครงการวิจัย ฉบับที่ 1.0 วันที่ 3 มิถุนายน 2556
2. โครงการวิจัยฉบับย่อ ฉบับที่ 1.0 วันที่ 3 มิถุนายน 2556

ลงนาม Tim Suvanto ลงนาม Patma P.  
(ศาสตราจารย์กิตติคุณแพทย์หญิงธาดา สีบหลินวงศ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์อภิชาติ วสุรัตน์)  
ประธาน กรรมการและเลขานุการ  
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

**วันที่รับรองการยกเว้นพิจารณาจริยธรรม** : 6 มิถุนายน 2556

- หมายเหตุ**
1. ไม่ต้องส่งรายงานความก้าวหน้า
  2. ส่งรายงานปิดโครงการเมื่อสิ้นสุดการศึกษา



COE No. 010/2013

IRB No. 280/56

## INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4455 ext 14, 15

## Certificate of Exemption

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has exempted the following study which is to be carried out in compliance with the international guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline, International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP) and 45CFR 46.101(b)

**Study Title** : Development Allele Specific Oligonucleotide Dot Blot Technique to Detect Common G6PD Mutations in Thailand

**Study Code** :-

**Principal Investigator** : Miss Orawan Kiat-amornrak

**Study Center** : Department of Biochemistry


**Document Reviewed** :

1. Protocol Version 1.0 Date June 3, 2013
2. Protocol synopsis Version 1.0 Date June 3, 2013

Signature:   
 (Emeritus Professor Tada Sueblinwong MD)

Chairperson

The Institutional Review Board

Signature:   
 (Assistant Professor Apichal Vasuratna MD)

Member and Secretary

The Institutional Review Board

**Date of Exemption** : June 6, 2013

- Note**
1. No Continuing review required
  2. Submit notification of final report when finish



## เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

### 1. เครื่องมือ

- 1.1. เครื่องมือวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ DNA Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific)
- 1.2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ YCW-010 (GEMMYCO)
- 1.3. เครื่องมือวัดค่าความเป็นกรดต่าง UB-10 (Ultra BASIC)
- 1.4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- 1.5. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านค่าได้ 2 ตำแหน่ง SY-YOU2 (DENVER INSTRUMENT)
- 1.6. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดอ่านค่าได้ 4 ตำแหน่ง PIONEER (OHAUS)
- 1.7. เครื่องแยกสารพันธุกรรมแนวอนขนาดเล็กแบบหน้ากว้างพร้อมเครื่องจ่ายไฟแบบปรับค่าได้ IMR-001 Intelligent Electrophoresis Unit i-MyRun.N (MY-RUN)
- 1.8. เครื่องวิเคราะห์ DNA บนแผ่นวุ้น Molecular Image® Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (BIO-RAD)
- 1.9. MicrowaveR-250 Light up Dial (SHARP)
- 1.10. เครื่องเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ

### 2. อุปกรณ์

- 2.1. 0.2 ml ultra Amp PCR products PDR tubes (Sorenson, Bioscience)
- 2.2. 0.65 ml Safeseal microcentrifuge tube (Sorenson, Bioscience)
- 2.3. 50 ml Centrifuge tube (CORNING)
- 2.4. 0.1-1 ul Long reach multifit pipette tips (Sorenson, Bioscience)
- 2.5. 1-200 ul multifit pipette tips (Sorenson, Bioscience)
- 2.6. 100-1000 ul multifit pipette tips (Sorenson, Bioscience)
- 2.7. 0.1-3 ul Proline Plus Pipettor (BIOHIT)
- 2.8. 2-20 ul Proline Plus Pipettor (BIOHIT)
- 2.9. 10-100 ul Proline Plus Pipettor (BIOHIT)
- 2.10. Parafilm PM-996 (PECHINEY)

### 3. สารเคมี

- 3.1. Trisodium citrate (SIGMA-AIDRICH)

- 3.2. Magnesium choridehexahydrate (BIO BASIC INC)
- 3.3. Tris-Hydroxymethyl (Fisher Scientific)
- 3.4. Magnesium choridehexahydrate (BIO BASIC INC)
- 3.5. Tris-Hydroxymethyl (Fisher Scientific)
- 3.6. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Plusone®Amersham Biosciences)
- 3.7. Sodium dodecyl sulphate (GE Healthcare)
- 3.8. 10 mM dNTP mix PCR Grade (Vivantis Technologies)
- 3.9. Platinum Taq DNA Polymerase (invitrogen)
- 3.10. Taq DNA Polymerase (Vivantis Technologies)
- 3.11. 10X PCR buffer (Vivantis Technologies)
- 3.12. 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Vivantis Technologies)
- 3.13. 100 bp Sharp DNA marker (RBC Bioscience)
- 3.14. 1 kb Plus DNA Ladder (invitrogen)
- 3.15. Novel juice 6X loading dye (GeneDireX)

### การเตรียมสารเคมี

#### TE buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA pH8.0)

- Tris-HCl 0.6055 กรัม
- EDTA 0.0185 กรัม
- เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ปรับ pH ให้เป็น 8.0
- นิ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

#### 0.5 EDTA pH 8.0

- $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$  93.05 กรัม
- $dH_2O$  400 มิลลิลิตร
- ปรับ pH ให้เป็น 8.0 แล้วเติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร
- นิ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

#### Stock solution 10% SDS (500ml)

- SDS 50 กรัม
- $dH_2O$  500 มิลลิลิตร

#### Stock solution 20X SSPE (1L)

- NaCl 175 กรัม
- EDTA 7.4 กรัม
- Sodium dihydrogen phosphate dehydrate ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ) 27 กรัม
- NaOH 8.5 กรัม
- $dH_2O$  เติมนจนครบปริมาตร 1 ลิตร

#### 100mM Sodium Citrate

- Sodium Citrate 29.4 กรัม
- $dH_2O$  1 ลิตร

#### (4X SSPE, 0.5% SDS)

- 20X SSPE 200 มิลลิลิตร
- 10% SDS 25 มิลลิลิตร
- $dH_2O$  500 มิลลิลิตร

#### (2X SSPE, 0.2% SDS)

-	20X SSPE	50	มิลลิลิตร
-	10% SDS	10	มิลลิลิตร
-	dH <sub>2</sub> O	500	มิลลิลิตร

**(1X SSPE, 0.2% SDS)**

-	20X SSPE	25	มิลลิลิตร
-	10% SDS	10	มิลลิลิตร
-	dH <sub>2</sub> Oเติมจนครบ	500	มิลลิลิตร

**10X TBE buffer**

-	Tris base (tris(hydroxymethyl)aminomethane)	108	กรัม
-	boric acid	55	กรัม
-	0.5M EDTA, disodium salt (pH8.0)	40	มิลลิลิตร
-	dH <sub>2</sub> O	1	ลิตร

**5X TBE buffer**

-	10X TBE buffer	250	มิลลิลิตร
-	dH <sub>2</sub> O	250	มิลลิลิตร

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	degree Celsius
μl	microliter
μM	micromolar
bp	base pair
Cm <sup>2</sup>	square centimeter
D	deficiency
DNA	deoxyribonucleic acid
G 6-PD	glucose 6-phosphate dehydrogenase
IU/g Hb	International unit/gram hemoglobin
M	molar
ml	milliliter
ng	nanogram
ng/μl	nanogram/microliter
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP-PCR	Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism
U	Unit

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวพัชรกร เกียรติอมรรัชช์
วัน เดือน ปี เกิด	8 กุมภาพันธ์ 2533
อายุ	26 ปี
เพศ	หญิง
สัญชาติ	ไทย
เชื้อชาติ	ไทย
ศาสนา	พุทธ
E-mail	yakumi_tarn@hotmail.com
ที่อยู่	30 หมู่ที่ 3 ต.ถนนใหญ่ อ.เมืองลพบุรี จ.ลพบุรี 15000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี