

การวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของหมู่เลือด MNS hybrid glycophorin (B-A-B) ในผู้บริจาค
โลหิตคนไทย โดยใช้เทคนิค High Resolution Melting Assay



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

GENOTYPING ANALYSIS OF NEW MNS HYBRID GLYCOPHORINS GYP*(B-A-B) IN THE
THAI BLOOD DONORS USING HIGH RESOLUTION MELTING ASSAY



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของหมู่เลือด MNS hybrid glycophorin (B-A-B) ในผู้บริจาคโลหิตคนไทย โดยใช้เทคนิค High Resolution Melting Assay
โดย	น.ส.พลอยมณี สุวรรณวุฒิชัย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ภัทธิน ตั้งชนตรระกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ภัทธิน ตั้งชนตรระกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รุ่งอรุณ พวงธรรม)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ภาวิณี คุปตวินทุ)

พลอยมณี สุวรรณวุฒิชัย : การวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของหมู่เลือด MNS hybrid glycophorin (B-A-B) ในผู้บริจาคโลหิตคนไทย โดยใช้เทคนิค High Resolution Melting Assay. (GENOTYPING ANALYSIS OF NEW MNS HYBRID GLYCOPHORINS GYP*(B-A-B) IN THE THAI BLOOD DONORS USING HIGH RESOLUTION MELTING ASSAY) อ.ที่ปรึกษาหลัก : อ. ดร.ภัทรินทร์ ตั้งชนตระกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.ทัศนีย์ สกุดดำรงคัพพานิช

ในปี 2018 มีการค้นพบ hybrid GP(B-A-B) ชนิดใหม่ซึ่งเกิดจากจีโนไทป์ แบบ homozygous *GYP*^{Mur}* สร้างเป็นแอนติเจนใหม่เรียก JENU ลบ ในประชากรชาวไทย ดังนั้นเพื่อศึกษาความถี่ของจีโนไทป์แบบ hybrid *GYP*^{Mur}* และ hybrid GYP ชนิดอื่นๆ ผู้วิจัยอาศัยเทคนิค Polymerase chain reaction High-Resolution Melting (PCR HRM) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผู้บริจาคโลหิตชาวไทย จำนวน 60 ราย ที่ให้ผลตรวจแอนติเจน s เป็นลบปลอมกับน้ำยา monoclonal IgM clone P3BER ผลค่า melting temperature จากตัวอย่างพีซีอาร์ที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่าง homozygous *GYP*^{Mur}* การหาลำดับเบสใช้ในตัวอย่างที่เป็น non-homozygous *GYP*^{Mur}* ทุกตัวอย่าง จากผลการทดลอง พบว่า ผู้บริจาคโลหิตจำนวน 49 รายเป็น homozygous *GYP*^{Mur}* (T_m เฉลี่ย 79.63 ± 0.03 , 90% CI = $79.337-81.302$) และ อีก 11 รายเป็น non-homozygous *GYP*^{Mur}* เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างดังกล่าวกับฐานข้อมูล พบว่า ตัวอย่างพบ 4 รายเป็น heterozygous *GYP*^{Mur}/^{Bun}*, 2 ราย เป็น homozygous *GYP*^{Bun}* และ 5 ราย เป็น heterozygous *GYP*^{BS}/^{GYP*^{Bun}}* สรุปผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คือ ความถี่ของแอนติเจน JENU ลบ คิดเป็นร้อยละ 0.65 ของประชากรชาวไทย โดยเทคนิค PCR HRM สามารถนำไปใช้ในงานประจำวันทางธนาคารเลือดได้จริง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6270008237 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: hybrid glycoprotein (B-A-B), GYP**Mur* homozygous, PCR HRM

Ploymanee Suwanwootichai : GENOTYPING ANALYSIS OF NEW MNS HYBRID GLYCOPHORINS GYP*(B-A-B) IN THE THAI BLOOD DONORS USING HIGH RESOLUTION MELTING ASSAY. Advisor: Pattarin Tangtanatakul Co-advisor: Tasanee Sakuldamrongpanich

Recently, a novel hybrid MNS GP(B-A-B) called JENU – antigen (homozygous *GYP**Mur**) was discovered in Thai population. By using polymerase chain reaction (PCR) high-resolution melting (HRM), our study aims to investigate the prevalence of homozygous *GYP**Mur** and other hybrid *GYP*(B-A-B)* in Thai blood donors. The DNA were extracted from 60 blood donor samples which gave false negative with monoclonal anti-s IgM clone P3BER. Melting temperature (T_m) of PCR products were compared with known (homozygous *GYP**Mur**) using 90% confident interval (CI). Sanger sequencing is used to confirm all samples of non-homozygous *GYP**Mur**. Result found that 49 of 60 samples were homozygous *GYP**Mur** while 11 samples were non-homozygous *GYP**Mur**. Interestingly, 4 of 11 samples were heterozygous *GYP**Mur*/Bu*, whereas 2 samples are homozygous *GYP**Bun**. Five samples are heterozygous *GYP**BS*/GYP**Bun**. In conclusion, prevalent of homozygous *GYP**Mur** (JENU-) in Thai blood donors was 0.65%. The PCR HRM assay could be used to identify *GYP**Mur** homozygous and screen for other hybrid *GYP*(B-A-B)* variants.

Field of Study: Molecular Science of
Medical Microbiology and
Immunology

Academic Year: 2020

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องด้วยความอนุเคราะห์จากท่าน อ.ดร.ภัทริน ตั้งธนะตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอ.ทัศนีย์ สกกุลดำรงคัพพานิช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมงานวิจัย ที่กรุณาให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ที่มีส่วนทำให้งานวิจัยครั้งนี้มีคุณค่ามากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ยังให้ความช่วยเหลือในการวางแผนการศึกษา ติดตามความก้าวหน้าจนทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์ตามเป้าหมายด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล อ.ดร. รุ่งอรุณ พวงธรรม และนางสาวภาวิณี คุปตวิญญู รองผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณะอาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้า และให้การอบรมให้ความรู้อย่างดีตลอดหลักสูตรการศึกษา

ขอขอบพระคุณ นางศิริลักษณ์ เพียรเจริญ หัวหน้าศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ และเจ้าหน้าที่ศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย ให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ แนะนำการปรับ PCR protocol และช่วยเหลือการเก็บตัวอย่าง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จและดำเนินไปอย่างราบรื่น

ขอขอบพระคุณ Dr. Genghis Lopez เจ้าหน้าที่ R&D division และ Dr. Yew Wah Liew หัวหน้า Red cell reference laboratory, Clinical and research division จาก Brisbane Processing Centre, Australian Red Cross ที่ให้คำแนะนำ HRM protocol และข้อมูล hybrid glycoporphin รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับเบส sequencing สนับสนุนให้งานวิจัยนี้ราบรื่นและสำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้าย ขอขอบพระคุณครอบครัวและเพื่อน พี่ น้อง ที่ให้การอบรมสั่งสอน สนับสนุนช่วยเหลือ ทำให้การศึกษาสำเร็จตามเป้าหมาย

พลอยมณี สุวรรณจุฑิชัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
ตาราง.....	ฉ
รูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	5
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
1.4 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	6
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.6 โครงสร้างของเนื้อหาวิทยานิพนธ์.....	7
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1.1 แอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดง.....	8
2.1.2 หมู่โลหิต MNS blood group system.....	10
2.1.3 Hybrid glycoporphin.....	15
2.1.4 hybrid glycoporphin (B-A-B).....	17
2.1.5 แอนติเจน JENU.....	20
2.1.6 แอนติบอดีต่อแอนติเจนของ hybrid glycoporphin.....	22

2.1.7	เทคนิค high resolution assay (HRM)	24
2.1.8	เทคนิค Sanger sequencing	26
2.2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	27
2.2.1	การศึกษา hybrid glycoprotein	27
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	30
3.1	การเก็บตัวอย่าง	30
3.2	การสกัด DNA โดยใช้เครื่องสกัด DNA อัตโนมัติ Symphony (Qiagen, German).....	31
3.3	การตรวจหาแอนติเจนที่แสดงบนเม็ดเลือดแดงโดยวิธีน้ำเหลืองวิทยาหรือการใช้แอนติบอดี	32
3.4	การออกแบบ primers	32
3.5	การตรวจ Genotyping โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction - High Resolution Melting Assay (PCR HRM).....	33
3.6	การแปลผลการทดสอบและสถิติที่ใช้	35
3.6.1	แปลผลโดยใช้ค่า Melting Temperature (T_m).....	35
3.6.2	แปลผลจากลักษณะของ melting peak	36
บทที่ 4	ผลการทดลอง	37
4.1	การเตรียมตัวอย่าง	38
4.2	การตรวจสอบความถูกต้องของ PCR และ HRM protocol.....	38
4.2.1	การตรวจสอบชนิดของ glycoproteins ที่นำมาเป็นตัวอย่างควบคุม.....	38
4.2.2	ขนาดของ PCR products	38
4.2.3	ค่า Melting temperature และลักษณะของ Melting peak ที่ได้	39
4.3	การตรวจ Genotyping โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction - High resolution melting (PCR HRM) ในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตชาวไทยจำนวน 60 ราย.....	40
4.3.1	การแปลผลจากค่า T_m	40
4.3.2	การแปลผลลักษณะของ melting peak.....	44

4.4 การหาลำดับเบสโดยใช้เทคนิค Sanger sequencing.....	45
4.5 ความถี่ของแอนติเจน JENU negative ในประชากรไทย	48
บทที่ 5 สรุปผลงานวิจัยและอภิปรายผล.....	49
5.1 อภิปรายผล.....	49
5.2 สรุปผลงานวิจัย.....	54
5.3 ข้อเสนอแนะ	55
5.4 งานวิจัยในอนาคต.....	55
บรรณานุกรม.....	57
ประวัติผู้เขียน.....	59
ภาคผนวก ก ตัวอย่างย่อที่ใช้ในงานวิจัย.....	63
ภาคผนวก ข ความเข้มข้นของ DNA ตัวอย่าง	64
ภาคผนวก ค ผลการ alignment ตัวอย่างที่ทราบชนิดของ glycoporphins.....	70
ภาคผนวก ง ผลการทดสอบตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตจำนวน 60 รายมาศึกษา Genotyping ด้วยวิธี PCR HRM และแปลผลชนิดของ glycoporphins	71
ภาคผนวก จ ผลการ alignment ตัวอย่างที่แปลผลเป็น non homozygous GYP* <i>Mur</i> จำนวน 11 ราย	75

ตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงแอนติเจนที่อยู่ในระบบ MNS (ISBT blood group antigens v.9.0).....	12
ตารางที่ 2 แสดง hybrid glycoporphin (GP) 14 ชนิด และปฏิกิริยาที่ antisera ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนต่างๆที่เกี่ยวข้องจำนวน 14 แอนติเจน(3).....	16
ตารางที่ 3 แสดง allele phenotype และแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับ hybrid glycoporphin (B-A-B).....	19
ตารางที่ 4 แสดงความถี่ของ glycoporphin จากการศึกษาในแต่ละประชากรและเทคนิคที่ต่างกัน.....	19
ตารางที่ 5 แสดงการศึกษาความถี่ของ glycoporphin ในคนไทย เปรียบเทียบระหว่างภูมิภาคเหนือและกลาง*.....	20
ตารางที่ 6 สรุปงานวิจัยและเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ศึกษา hybrid glycoporphin	28
ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำยาในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม	34
ตารางที่ 8 แสดง PCR cycle protocol.....	34
ตารางที่ 9 ผลของ Tm ที่คาดว่าจะได้ จาก hybrid glycoporphinแต่ละชนิด	35
ตารางที่ 10 ความแตกต่างค่า Tm ของตัวอย่างที่ทราบชนิด glycoporphin	42
ตาราง 11 ตัวอย่างการแปลผลการทดสอบโดยใช้ค่า Tm เฉลี่ย เปรียบเทียบค่า 90%CI ของตัวอย่างควบคุม homozygous GYP* ^{Mur} (JENU-) แปลผลเป็น Homozygous GYP* ^{Mur} (JENU-)	43
ตารางที่ 12 ตัวอย่างการแปลผลการทดสอบโดยใช้ค่า Tm เฉลี่ย เปรียบเทียบค่า 90%CI ของ control homozygous GYP* ^{Mur} (JENU-) แปลผลเป็น non homozygous GYP* ^{Mur}	43
ตารางที่ 13 สรุปการแปลผลการตรวจรูปแบบของ hybrid glycoporphin (B-A-B) ในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตชาวไทย ที่มีผลการตรวจ s- แอนติเจนด้วย anti-s monoclonal IgM clone P3BER ให้ผลลบ แต่การตรวจ anti-s polyclonal IgG ให้ผลบวก.....	44
ตารางที่ 14 แสดงผล alignment และการแปลผลชนิด glycoporphins ในตัวอย่างที่เปรียบเทียบค่า Tm แปลผลได้เป็น non homozygous GYP* ^{Mur}	47

ตารางที่ 15 สรุปจำนวนของ glyco-phorins แต่ละชนิดในตัวอย่างที่แปลผลเป็น non homozygous GYP*Mur 48

ตารางที่ 16 ความถี่ของแอนติเจน JENU ในประชากรคนไทย และ glyco-phorins ที่ทำให้เกิดผลลบปลอมในการตรวจแอนติเจน s ด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER..... 49



รูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 กรอบความคิดงานวิจัย.....	5
รูปภาพที่ 2 แสดงหมู่โลหิตระบบต่างๆ จำแนกตามประเภทของส่วนประกอบทางชีวเคมี ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีนบนเม็ดโลหิตแดง(6).....	9
รูปภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของ glycophorin A (GPA) และ glycophorin B (GPB).....	11
รูปภาพที่ 4 แสดง GPA ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกของแอนติเจน M (ซ้าย) N (ขวา).....	13
รูปภาพที่ 5 แสดง GPB ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกของแอนติเจน S และ s.....	14
รูปภาพที่ 6 แสดงกลไกการเกิด unequal crossing over และ gene conversion ทำให้เกิด GYP* (A-B), GYP*(B-A), GYP*(A-B-A) และ GYP*(B-A-B)(23).....	15
รูปภาพที่ 7 แสดงยีน hybrid glycophorin ชนิดต่างๆ ที่ทำให้เกิดรูปแบบ glycophorin (GP) หรือ Mi ที่แตกต่างกัน และแอนติเจนต่างๆที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจัดเป็น low- incidence antigens(6) ...	17
รูปภาพที่ 8 แสดงลำดับโปรตีนที่แตกต่างของแต่ละ Glycophorin.....	18
รูปภาพที่ 9 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างผู้ป่วยและผู้บริจาค JENU.....	21
รูปภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งลำดับโปรตีนที่จำเพาะของน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER และ polyclonal IgG.....	22
รูปภาพที่ 11 ตัวอย่างการทดสอบยีน FTO โดยใช้เทคนิค HRM ที่ตำแหน่ง c.46-23525T>A (rs9939609), c.46-23540G>A (rs76804286) และ c.46-23549G>A (rs9926289).....	24
รูปภาพที่ 12 สรุปขั้นตอนการวิจัย ซึ่งประกอบด้วย การคัดเลือกตัวอย่างเพื่อทดสอบ PCR HRM และการแปลผลการทดสอบ โดยกรณีที่ไม่ใช่แอนติเจน JENU negative จะทำการตรวจด้วย Sanger sequencing เพื่อระบุชนิดของ GYP gene ต่อไป.....	30
รูปภาพที่ 13 แสดงลำดับเบสของ GYP*A, GYP*B, GYP* ^{Mur} และ GYP* ^{Bun} และตำแหน่งที่ primers จำเพาะ (สีฟ้าคือตำแหน่งของ forward primer และสีเหลืองคือตำแหน่งของ reverse primer) ขนาดของ PCR product ที่คาดว่าจะได้คือ 270 bp.....	33

รูปภาพที่ 14 แสดงลักษณะของ melting peak ที่คาดการณ์ เกิดจากการที่มี glycoporin ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ค่า Tm ของแต่ละชนิดแตกต่างกัน 36

รูปภาพที่ 15 แสดงขนาด PCR product ที่ได้จากการ run gel electrophoresis 39

รูปภาพที่ 16 ลักษณะ melting peak ของตัวอย่างที่ทราบชนิด glycoporins สามารถแยกลักษณะและค่า Tm ที่แตกต่างกันได้..... 40

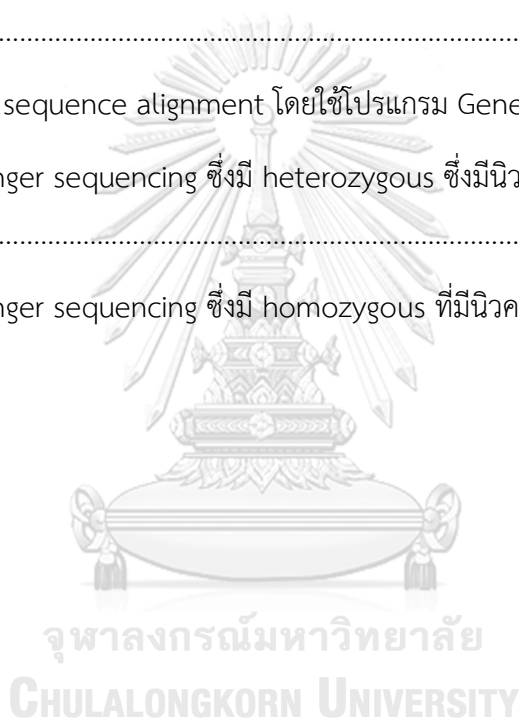
รูปภาพที่ 17 แสดง melting curve ของตัวอย่าง ซึ่งให้ค่า Tm อยู่ในช่วงการวิเคราะห์ 70-90°C. 41

รูปภาพที่ 18 แสดง melting peak ของตัวอย่าง สามารถแบ่งลักษณะของ peaks ได้เป็น 3 ลักษณะหลัก..... 45

รูปภาพที่ 19 ผลการ sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime..... 86

รูปภาพที่ 20 ผล Sanger sequencing ซึ่งมี heterozygous ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ C และ A ที่ตำแหน่ง 129 86

รูปภาพที่ 21 ผล Sanger sequencing ซึ่งมี homozygous ที่มีนิวคลีโอไทด์ G ที่ตำแหน่ง 118.. 87



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

หมู่โลหิต MNS เป็น glycoprotein บนผนังเม็ดโลหิตแดง มีส่วนประกอบที่อยู่ นอกเซลล์และแทรกภายในผนังเม็ดโลหิตแดงรวมทั้งภายในไซโตพลาสซึม ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรักษาประจุลบระหว่างผนังเซลล์เม็ดโลหิตแดงและการค้าจูนโปรตีน Band 3 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการโครงสร้างของเม็ดโลหิตแดง นอกจากนี้ glycoprotein ชนิดนี้ยังเป็นจุดเกาะติดของเชื้อโรค หลายชนิด เช่น influenza virus(1) และ encephalomyocarditis virus(2) *Plasmodium Falciparum*(3) เป็นต้น

หมู่โลหิต MNS เป็นหมู่โลหิตที่ค้นพบเป็นลำดับที่ 2 หลังจากการค้นพบหมู่โลหิต ABO เป็นหมู่โลหิตที่มีความซับซ้อนรองจากหมู่โลหิต Rh เนื่องจากเป็นหมู่โลหิตที่มีความกลายพันธุ์สูงจากการที่ยีนที่เกี่ยวข้องนั้นมีความใกล้เคียงกันมากกว่า 95%(4) ปัจจุบัน มีการค้นพบแอนติเจนในระบบหมู่โลหิต MNS จำนวน 50 แอนติเจน(5)

แอนติบอดีต่อหมู่โลหิต MNS พบได้ทั้งชนิด IgM และ IgG ซึ่งทำงานธนาकारเลือด หากแอนติบอดีในระบบ MNS ไม่ทำปฏิกิริยาที่ 37°C จัดว่าไม่สำคัญทางคลินิก แต่มีรายงานพบแอนติบอดีชนิด IgG ในผู้ป่วยที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาหลังรับโลหิต (hemolytic transfusion reaction) และเกิดภาวะทำลายเม็ดโลหิตแดงในทารกทั้งในครรภ์และหลังคลอด (hemolytic disease of fetus and new born) โดยมีความรุนแรงแตกต่างกัน ตั้งแต่อาการไม่รุนแรงไปจนถึงเด็กทารกเสียชีวิตจากภาวะ hydrops fetalis(6, 7)

ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจนในระบบหมู่โลหิต MNS ได้แก่ *GYP*A*, *GYP*B* และ *GYP*E* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 (4q31.21) โดยทั้ง 3 ยีนนี้มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 95(4) ยีน *GYP*A* ประกอบด้วย 7 exons สร้างเป็นโปรตีน glycoprotein A (GPA) มีแอนติเจนที่สำคัญ ได้แก่ M และ N ยีน *GYP*B* ประกอบด้วย 6 exons และมี 1 pseudo exon ที่ exon ลำดับที่ 3 สร้างเป็นโปรตีน glycoprotein B (GPB) มีแอนติเจนที่สำคัญ ได้แก่ S และ s

สำหรับยีน *GYP*E* ประกอบด้วย 6 exons และมี pseudo exon ที่ exon ลำดับที่ 3 และ 4 ซึ่งตามปกติจะไม่แสดงออกบนผิวเม็ดโลหิตแดง ยกเว้นเมื่อมีการจัดเรียงยีนรูปแบบใหม่และเกิด variant ของยีน *GYP*E(4)*

การเกิดแอนติเจนใหม่บนเม็ดโลหิตแดงในระบบหมู่โลหิต MNS เกิดได้จาก 3 สาเหตุ

(1) เกิดจาก Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) เช่น แอนติเจน M/N (การเปลี่ยนแปลงของ *GYP*A* ที่ตำแหน่ง 59 จาก C/T, ตำแหน่งที่ 71 จาก G/A และตำแหน่งที่ 72 จาก T/G) และแอนติเจน S/s (การเปลี่ยนแปลงของ *GYP*B* ที่ตำแหน่ง 143 จาก T/C) เป็นต้น(6)

(2) เกิดจากการขาดหายไปของยีน ได้แก่ Ena (การขาดหายไปของ *GYP*A*), U (การขาดหายไปของ *GYP*B*) และ Mkmk (การขาดหายไปของ *GYP*A* และ *GYP*B*)(6) เป็นต้น ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่มีผลทำให้โครงสร้างของเม็ดโลหิตแดงเปลี่ยนแปลงไป

(3) เกิดจากการแลกเปลี่ยนยีนแบบ crossing over ได้ 2 แบบ และทำให้เกิดยีนในรูปแบบ hybrid gene 4 รูปแบบ คือ 1) การแลกเปลี่ยนยีนที่ไม่เท่ากัน (unequal crossing over) เกิด hybrid gene ได้แก่ *GYP*(A-B)* และ *GYP*(B-A)* 2) การเกิดการแลกเปลี่ยนบางส่วนของยีน (gene conversion) เกิด hybrid gene ได้แก่ *GYP*(A-B-A)* และ *GYP*(B-A-B)* ซึ่งขนาดของยีนและตำแหน่งของยีนที่แลกเปลี่ยนนั้น มีผลทำให้เกิดแอนติเจนที่แตกต่างกัน

hybrid glycoporphin *GYP*(A-B)*, *GYP*(B-A)*, *GYP*(A-B-A)* และ *GYP*(B-A-B)* ทำให้เกิดกลุ่มโปรตีน hybrid glycoporphin (GP) ได้อย่างน้อย 14 ชนิด แบ่งตามปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจด้วย specific antisera ได้แก่ GP. Hil, GP. JL, GP. Sch, GP. Dantu, GP. Vw, GP. Hut, GP. Nob, GP. Joh, GP. Dane, GP. Mur, GP. Hop, GP. Bun, GP. HF และ GP. Kip ซึ่งมีแอนติเจนที่แตกต่างกันจำนวน 14 ชนิด ได้แก่ Mi^a , Vw, Hut, Mur, MUT, Hil, TSEN, MINY, Hop, Nob, DANE, St^a , Dantu และ KIPP เรียกแอนติเจนกลุ่มนี้โดยรวมว่า Miltenberger subsystem หรือแอนติเจน Mi^a โดย hybrid glycoporphin แต่ละชนิด จะมีการแสดงออกของแอนติเจนที่แตกต่างกัน เช่น GP.Hil ประกอบด้วยแอนติเจน Hil และ MINY หรือ GP.Mur ประกอบด้วยแอนติเจน Mi^a , MUR, MUT, Hil และ MINY เป็นต้น การระบุแอนติเจนเหล่านี้ทางน้ำเหลืองวิทยา จำเป็นต้องมี

แอนติซีรัมที่จำเพาะ ซึ่งหาได้ยาก จึงไม่นิยมทดสอบเพื่อแยกกลุ่มของแอนติเจน และเรียกผู้ที่มี hybrid glycoprotein เหล่านี้ว่า Mi^a antigen positive จัดเป็นแอนติเจนในกลุ่ม Low- incidence antigen หมายถึง พบได้น้อยกว่าร้อยละ 1 ของประชากรผิวขาว (Caucasian)(6) แต่ในทางตรงข้าม กลับพบแอนติเจนกลุ่มนี้มากในประชากรเชื้อสายเอเชีย เช่น ประชากรชาวไทยกลับพบแอนติเจน Mi^a ร้อยละ 9.8(8) ชาวจีนพบร้อยละ 6.5(9) ชาวเวียดนามพบ ร้อยละ 6.5(10) และชาวฟิลิปปินส์พบ ร้อยละ 7.6(11)

แต่ละ glycoproteins จะสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่แตกต่างกัน เรียกแอนติบอดีนี้รวมว่า anti- Mi^a อย่างไรก็ดี ในกรณีที่สามารถแยกชนิดของแอนติเจนได้ จะมีการรายงานเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ เช่น ในปี ค.ศ. 2014 ได้มีรายงานผู้ป่วยคนไทยตรวจพบ anti-Hop ซึ่งให้ผล positive เฉพาะเซลล์ที่มีแอนติเจน Hop(+) และ $Mi(a+)$ เท่านั้น(12) หรือในกรณี ปี ค.ศ. 2016 ตรวจพบ anti-Hil ในผู้ป่วยชาวไทยซึ่งให้ผล positive ในเซลล์ที่มีแอนติเจน Hil(+) และ $Mi(a+)$ เป็นต้น(13) ซึ่งกรณีดังกล่าวข้างต้น พบได้น้อยเนื่องจาก วิธีที่ใช้ตรวจกรองแอนติบอดีด้วยเซลล์มาตรฐาน จะไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีเหล่านี้ได้และจำเป็นต้องใช้เซลล์ที่มีการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะ จะเห็นได้ว่า anti- Mi^a ที่ใช้เป็น polyspecific antibody มีความหลากหลายประกอบด้วยแอนติบอดีต่อแอนติเจนหลายชนิดที่ต่างกันของ Mi subsystem ทำให้ screening cells ที่ใช้ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีในกลุ่มนี้ได้ทุกชนิด จึงอาจพบปัญหาการจำกัดโลหิตให้กับผู้ป่วยได้ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ในผู้ป่วยประชากรชาวไทยจะพบ anti- Mi^a ร้อยละ 41.3(14) ชาวจีน ร้อยละ 57.6(15) หรือแม้กระทั่งในผู้บริจาคโลหิตชาวไทยที่ไม่มีประวัติรับโลหิตมาก่อน สามารถตรวจพบ anti- Mi^a ได้ร้อยละ 11.1(16) และ ร้อยละ 7.3 ในผู้บริจาคโลหิตชาวไต้หวัน (17)

hybrid glycoprotein (B-A-B) เกิดจากการแทรกบางส่วนของยีน GYP^A เข้าสู่ ยีน GYP^B ทำให้เกิดการแสดงออกของ pseudo exon 3 ซึ่งมีด้วยกันทั้งหมด 5 รูปแบบที่ถูกค้นพบแล้ว แบ่งตามความยาวและตำแหน่งของยีน GYP^A ที่ insert เข้าสู่ยีน GYP^B ได้แก่ GP.Mur (ความยาว 55 bp ที่ตำแหน่ง 3' intron), GP.Kip (ความยาว 35 bp ที่ตำแหน่ง 3' intron), GP.HF (ความยาว 98 bp ที่ตำแหน่ง 3' intron), GP.Bun (ความยาว 131 bp ที่ตำแหน่ง 5' exon) และ GP.Hop (ความยาว 131 bp ที่ตำแหน่ง 5' exon)(6, 18)

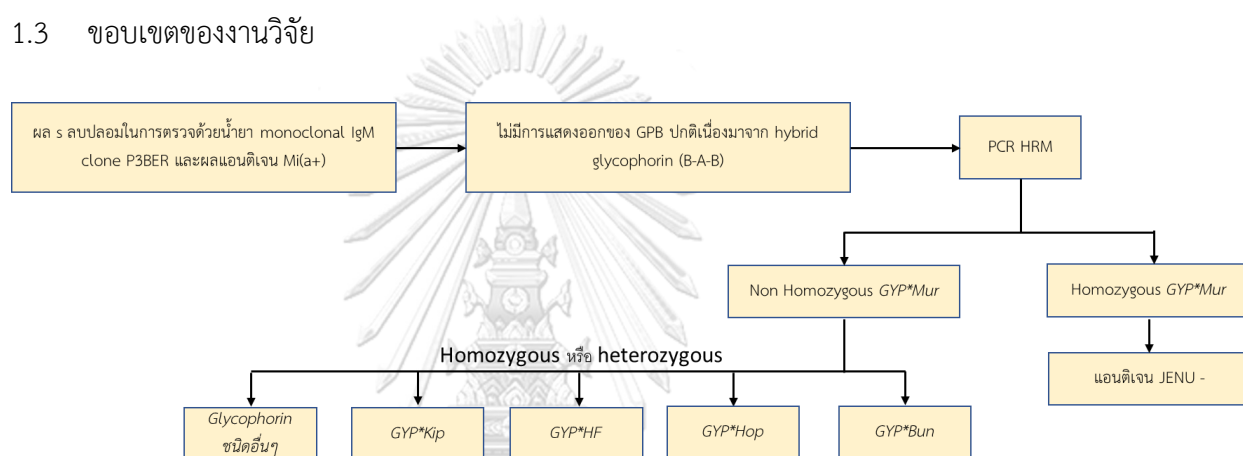
ในปี ค.ศ. 2018 มีรายงานพบแอนติเจนชนิดใหม่ คือ JENU (MNS 49)(19) โดยพบ ผู้ป่วย ไทยมีแอนติบอดีต่อ high incidence antigen เมื่อตรวจสอบแอนติเจนที่แสดงออกบนผิวเม็ดเลือดแดงของเซลล์ผู้ป่วย พบมีลักษณะจำเพาะคือ ให้ผลแอนติเจน s ลบ เมื่อทดสอบกับน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER แต่เมื่อทดสอบกับน้ำยา anti-s polyclonal IgG กลับให้ผล s+ เมื่อทำการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่า สาเหตุการเกิดปรากฏการณ์ลักษณะนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมแบบ homozygous *GYP*^{Mur}* ซึ่งเป็น *GYP*(B-A-B)* ชนิดใหม่ (JENU-) ซึ่งผู้ป่วยที่มีพีโนไทป์นี้ เมื่อได้รับโลหิต GPB ปกติ (JENU+) จะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีซึ่งเป็นปัญหาในการจัดหาโลหิต ต่อมา Jongruamklang และคณะ(20) ศึกษาผู้บริจาคโลหิตชาวไทยที่มีแอนติเจน Mi(a+) และพบว่าผู้บริจาคโลหิต 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 8 ที่ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ โดยทั้ง 5 รายนี้ ให้ผลลบในการทดสอบแอนติเจน s กับ monoclonal IgM anti-s แต่บวกกับ IgG alloanti-s เมื่อทำวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคนิค Sequencing พบว่า 3 ราย เป็น homozygous *GYP*^{Mur}* และ 2 ราย เป็น heterozygous *GYP*^{Mur}/*GYP*^{Bun-like}** ซึ่งเป็น *GYP*(B-A-B)* เช่นเดียวกัน เมื่อทำการทดสอบ flow cytometry เพื่อศึกษาปริมาณของแอนติเจน s ในตัวอย่าง 5 รายนี้ พบว่า มีการแสดงออกของแอนติเจน s ลดลงอย่างชัดเจน เมื่อทดสอบด้วยน้ำยา monoclonal IgM anti-s แต่มีการแสดงออกของแอนติเจน s ปกติเมื่อทดสอบกับน้ำยา IgG alloanti-s

จากการศึกษาของผู้วิจัย 2 กลุ่มนี้ ทำให้ทราบว่า ในคนไทยมีโอกาที่จะพบ hybrid glycoporphins (B-A-B) ชนิด homozygous *GYP*^{Mur}* ได้ เนื่องจาก GP.Mur พบมากในคนไทย ทำให้เกิดความยุ่งยากในการหาโลหิตที่เข้ากันได้ให้ผู้ป่วย เนื่องจากไม่มีน้ำยา antisera ที่จำเพาะมากพอในการคัดกรองหาผู้บริจาคโลหิตที่มีแอนติเจน JENU- ดังนั้นการศึกษานี้ จึงนำเทคนิค polymerase chain reaction high-resolution melting (PCR HRM) มาตรวจวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของหมู่โลหิต MNS hybrid glycoporphins (B-A-B) ในผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เพื่อจัดหาผู้บริจาคโลหิตรองรับผู้ป่วยที่หาโลหิตได้ยากในกลุ่มนี้ โดยเทคนิคนี้สามารถตรวจได้จำนวนมาก ใช้เวลาไม่นาน และมีความถูกต้องสูง นอกจากนี้ การทดสอบ PCR HRM อาจนำไปสู่การค้นพบ hybrid glycoporphin (B-A-B) รูปแบบใหม่

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาความถี่ของ homozygous *GYP*Mur* (JENU-) และตรวจหารูปแบบทางพันธุกรรมของ hybrid glycophorins (B-A-B) ชนิดอื่นในผู้บริจาคโลหิตชาวไทย ในตัวอย่างที่ทำให้เกิดผลลบปลอมในการตรวจแอนติเจน s ด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER แต่ให้ผลบวกเมื่อดำเนินการด้วยน้ำยา polyclonal IgG

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย



รูปภาพที่ 1 กรอบความคิดงานวิจัย

จากการศึกษาที่ผ่านมา ตัวอย่างโลหิตที่ตรวจหาแอนติเจน s ด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER แล้วให้ผลเป็นลบปลอม แต่เมื่อตรวจด้วยน้ำยา anti-s polyclonal IgG. จะให้ผลเป็นบวก เนื่องจากไม่มี GPB ปกติ ซึ่งเกิดจากรูปแบบของยีนเป็น hybrid glycophorin (B-A-B) จะสร้างเป็น glycoprotein ได้อย่างน้อย 5 แบบ คือ GP.Mur, GP. Bun, GP.Hop, GP.HF และ GP.Kip โดยประชากรชาวไทยพบ GP.Mur และ GP.Bun มากกว่า GP อื่นๆ และจะพบรูปแบบของยีนเป็น homozygous *GYP*Mur* มากที่สุด การศึกษาในครั้งนี้ จะตรวจการ แสดงออกของยีนในกลุ่ม hybrid glycophorin (B-A-B) ในตัวอย่างโลหิตจากผู้บริจาคที่บริจาคที่ ศูนย์บริการโลหิตหรือหน่วยรับบริจาคโลหิตเคลื่อนที่ในเขตกรุงเทพมหานครเท่านั้น โดยตรวจด้วย เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) high resolution melting (HRM) และศึกษาในกลุ่ม ตัวอย่างจำนวนมาก เพื่อหาความถี่ของยีน homozygous *GYP*Mur* (JENU-) และอาจพบรูปแบบ

ของยีนชนิดอื่นที่แตกต่างจากยีนที่เคยมีรายงานแล้วซึ่งจะทำการตรวจระบุชนิดของ glycoporphins ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ต่อไป

1.4 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

1.4.1 ศึกษาทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

1.4.2 เลือกวิธีการทดสอบ

1.4.3 ออกแบบการทดลอง

1.4.4 เก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่าง

1.4.5 ทดสอบกับตัวอย่างที่ทราบรูปแบบ glycoporphin เพื่อหา condition

1.4.6 ทดสอบตัวอย่าง

1.4.7 คำนวณค่าสถิติเพื่อเปรียบเทียบ T_m ของรูปแบบ hybrid glycoporphin

1.4.8 ส่งตรวจ Sanger sequencing ในตัวอย่างที่แปลผลไม่ใช่ homozygous *GYP*^{Mur}* (JENU-)

1.4.9 แปลผล sequencing

1.4.10 วิเคราะห์ความถี่และอภิปรายผล

1.4.11 จัดทำรูปเล่มงานวิจัย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบความถี่ของ homozygous *GYP*^{Mur}* (แอนติเจน JENU ลบ) ซึ่งมีประโยชน์ในการจัดหาโลหิตให้กับผู้ป่วยที่มี anti-JENU ในอนาคต รวมถึงศึกษาความถี่ของรูปแบบ hybrid

glycophorin (B-A-B) ที่แตกต่างกัน ที่ทำให้เกิดผลการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาเช่นเดียวกับแอนติเจน JENU

1.5.2 เพื่อศึกษาหารูปแบบของยีนชนิดอื่นในกลุ่ม hybrid glycophorin (B-A-B) ที่ทำให้เกิดผลต่อการตรวจแอนติเจน s ผลที่ได้จะนำมาพิจารณาการเลือกใช้น้ำยา anti-s ที่เหมาะสมในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1.5.3 ความถี่ของยีนในกลุ่มนี้ ทำให้สามารถคาดการณ์ความเสี่ยงต่อการรับโลหิตแบบสุ่มในประชากรคนไทย และทราบโอกาสในการจัดหาโลหิตที่เหมาะสมให้ผู้ป่วย เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับโลหิตที่ปลอดภัย

1.6 โครงสร้างของเนื้อหาวิทยานิพนธ์

โครงสร้างของวิทยานิพนธ์ ประกอบไปด้วย 5 บท ได้แก่

- บทที่ 1 กล่าวถึงที่มาและความสำคัญของปัญหา วัตถุประสงค์ ขอบเขตของงานวิจัย ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ
- บทที่ 2 กล่าวถึงทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- บทที่ 3 กล่าวถึงแนวคิดและวิธีการดำเนินงาน
- บทที่ 4 กล่าวถึงการทดสอบและประเมินผลงานวิจัย
- บทที่ 5 กล่าวถึงบทสรุป

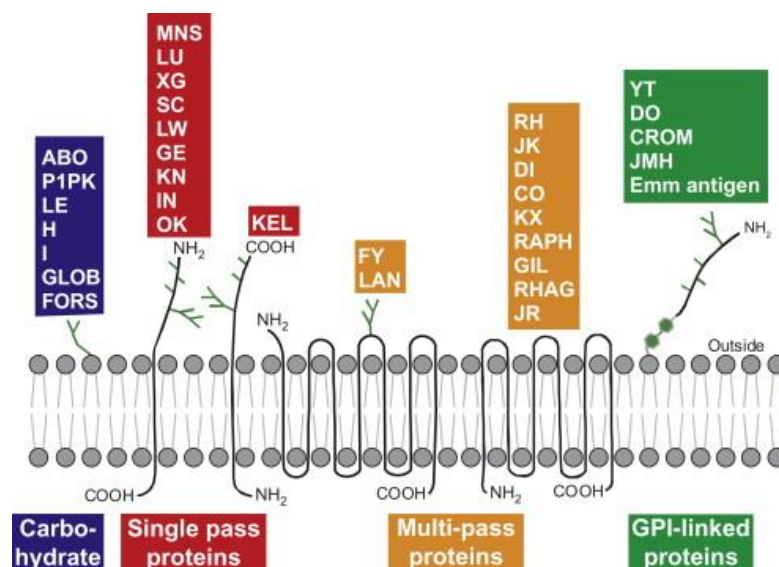
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 แอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดง

แอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดง คือส่วนประกอบของเม็ดโลหิตแดงที่สามารถกระตุ้นสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ มีองค์ประกอบเป็นโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรต ดังรูปภาพที่ 2 ในปีค.ศ. 1900 โดย Karl Landsteiner เป็นผู้ค้นพบแอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดงครั้งแรก คือแอนติเจน A และ B ของหมู่โลหิตระบบ ABO ต่อมามีการพบแอนติเจนที่แตกต่างกันของหมู่โลหิตระบบต่างๆบนเม็ดโลหิตแดงมากขึ้นเรื่อยๆ โดยความแตกต่างหลากหลายของแอนติเจนที่เกิดขึ้น สมมติฐานว่าอาจเกิดจากเชื้อชาติที่แตกต่างกันการย้ายถิ่นฐาน รวมถึงสภาพแวดล้อมที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีนบนเม็ดโลหิตแดง นำไปสู่การเกิดแอนติเจนใหม่ๆของหมู่โลหิตระบบใหม่ๆอยู่เสมอ (21) การที่แอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดงมีการค้นพบและมีเปลี่ยนแปลงจำนวนแอนติเจนอยู่เสมอ ทำให้การเรียกชื่อแอนติเจนและระบบหมู่โลหิตใหม่ๆที่เกิดขึ้นมีความยุ่งยากซับซ้อนมากขึ้นเรื่อยๆ ในปี ค.ศ. 1935 องค์กรสากล The International Society of Blood Transfusion (ISBT) ได้จัดตั้งขึ้น โดยมีเป้าหมายเพื่อรับผิดชอบเกี่ยวกับเวชศาสตร์ธนาคารเลือดและการปลูกถ่ายอวัยวะและเซลล์ระดับโลก นำไปสู่การพัฒนาเวชศาสตร์ธนาคารเลือดให้มีความปลอดภัยได้มาตรฐานสากล พัฒนาความรู้ เทคโนโลยี การศึกษาในด้านการบริการผู้ป่วยและการรับบริจาคโลหิต และยังมีหน้าที่รับผิดชอบการประกาศชื่อและจัดแอนติเจนต่างๆบนเม็ดโลหิตแดงเป็นระบบหมู่โลหิต ปัจจุบัน ISBT ได้ให้การรับรองและประกาศระบบหมู่โลหิตบนเม็ดเลือดแดงจำนวน 42 ระบบ(5)



รูปภาพที่ 2 แสดงหมู่โลหิตระบบต่างๆ จำแนกตามประเภทของส่วนประกอบทางชีวเคมี ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีนบนเม็ดโลหิตแดง(6)

องค์กร ISBT ได้จำแนกชนิดของแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง เป็น 4 กลุ่มใหญ่(6) ได้แก่

1) Blood group system คือ แอนติเจนที่พบและจะกำหนดให้เป็นแอนติเจนใหม่ของระบบหมู่โลหิตต้องมีคุณสมบัติครบถ้วนตามข้อกำหนด ดังนี้

- มีการสร้างแอนติบอดี ชนิด alloantibody ในมนุษย์
- มีลักษณะของการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ซึ่งศึกษาได้จาก family study
- ค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของแอนติเจนนั้น
- ค้นพบตำแหน่งโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับยีนนั้น
- ยีนที่ค้นพบนั้น แตกต่างจากยีนอื่นๆที่เคยถูกค้นพบมาก่อนหน้านี้

ตัวอย่าง blood group system เช่น ระบบ MNS ซึ่งมีแอนติเจนจำนวน 50 แอนติเจน เป็นต้น

2) Blood group collections คือแอนติเจนที่ยังขาดการศึกษาทางด้านพันธุกรรมอย่างชัดเจน มีความถี่ของแอนติเจนในประชากรอยู่ในช่วงร้อยละ 1.01 – 89.9 ตัวอย่างแอนติเจนในกลุ่มนี้ เช่น Le^c เป็นต้น

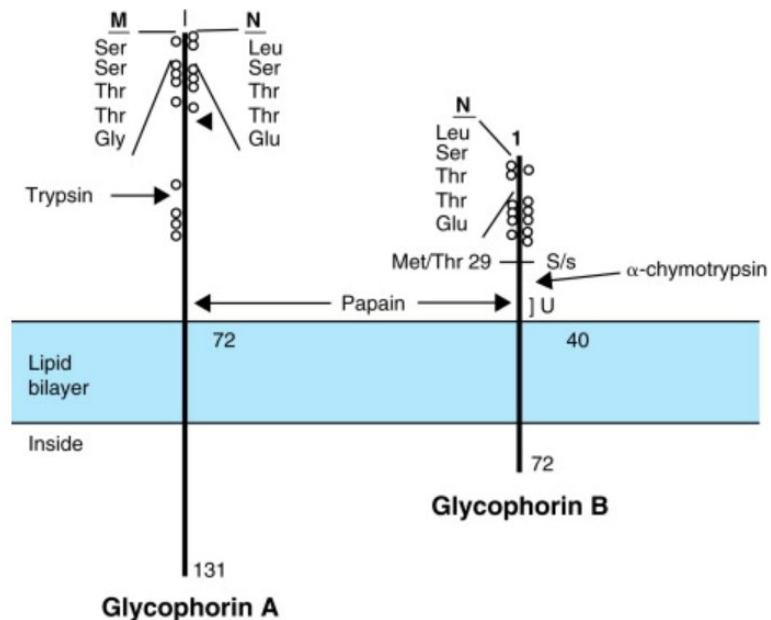
- 3) Low - incidence antigen (LFA) คือแอนติเจนที่ยังขาดการศึกษาทางด้านพันธุกรรมอย่างชัดเจน มีความถี่ของแอนติเจนในประชากรน้อยกว่าร้อยละ 1 ตัวอย่างแอนติเจนในกลุ่มนี้ เช่น By และ Chr^a เป็นต้น
- 4) High - incidence antigen (HFA) คือแอนติเจนที่ยังขาดการศึกษาทางด้านพันธุกรรมอย่างชัดเจน มีความถี่ของแอนติเจนในประชากรมากกว่าร้อยละ 90 ตัวอย่างแอนติเจนในกลุ่มนี้ เช่น Emm และ At^a เป็นต้น

ทั้งนี้เมื่อแอนติเจนกลุ่ม Blood group collection, LFA และ HFA มีข้อมูลการศึกษาทางด้านพันธุกรรมอย่างชัดเจน องค์กร ISBT จะทำการเปลี่ยนแอนติเจนดังกล่าวเป็น blood group system โดยอาจจัดรวมอยู่ใน blood group system ที่มีอยู่แล้วหรือจัดเป็น blood group system ใหม่ ขึ้นกับข้อมูลการศึกษาทางพันธุกรรมมีความสอดคล้องหรือแตกต่างกับ blood group system ที่ค้นพบก่อนหน้านี้หรือไม่ ตัวอย่างแอนติเจนที่เปลี่ยนแปลงจาก HFA เป็น novel blood group system เช่น MAM(22) เป็นต้น จะเห็นว่าการจำแนกชนิดของแอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดง มีความจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาระดับอนุชีววิทยา เพื่อระบุว่าเป็นแอนติเจนชนิดใหม่ หรือยืนยันแอนติเจนที่ค้นพบแล้วแต่ไม่สามารถตรวจได้ทางน้ำเหลืองวิทยา ดังนั้น การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมจึงเข้ามามีบทบาทในงานธนาคารเลือดมากขึ้น

2.1.2 หมู่โลหิต MNS blood group system

หมู่โลหิตระบบ MNS เป็นหมู่โลหิตที่ค้นพบเป็นลำดับที่ 2 หลังจากการค้นพบหมู่โลหิตระบบ ABO โดย Landsteiner และ Levine ในปี ค.ศ. 1927(6) เป็นหมู่โลหิตที่มีความซับซ้อนรองจากหมู่โลหิต Rh เนื่องจากเป็นหมู่โลหิตที่มีความกลายพันธุ์สูงจากการที่ยีนที่เกี่ยวข้องมีความใกล้เคียงกันมากกว่าร้อยละ 95(4) หมู่โลหิตนี้อยู่บน glycophorin A และ glycophorin B บนผิวเม็ดโลหิตแดง ซึ่งโปรตีนนี้มีส่วนประกอบที่อยู่นอกเซลล์ แทรกอยู่ในผนังเม็ดโลหิตแดง และภายในไซโตพลาสซึม ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรักษาประจุลบในผนังเม็ดโลหิตแดง และการค้าจุนโปรตีน Band 3 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการโครงสร้างของเม็ดโลหิตแดง ดังแสดงในรูปภาพที่ 3 และยังพบแอนติเจน MNS ที่ Renal endothelium และ epithelium ด้วย(6) นอกจากนี้ glycoprotein ชนิดนี้ยังเป็นจุดเกาะติด

ของเชื้อโรคหลายชนิด เช่น influenza virus(1) encephalomyocarditis virus(2) และ *Plasmodium Falciparum*(3) เป็นต้น



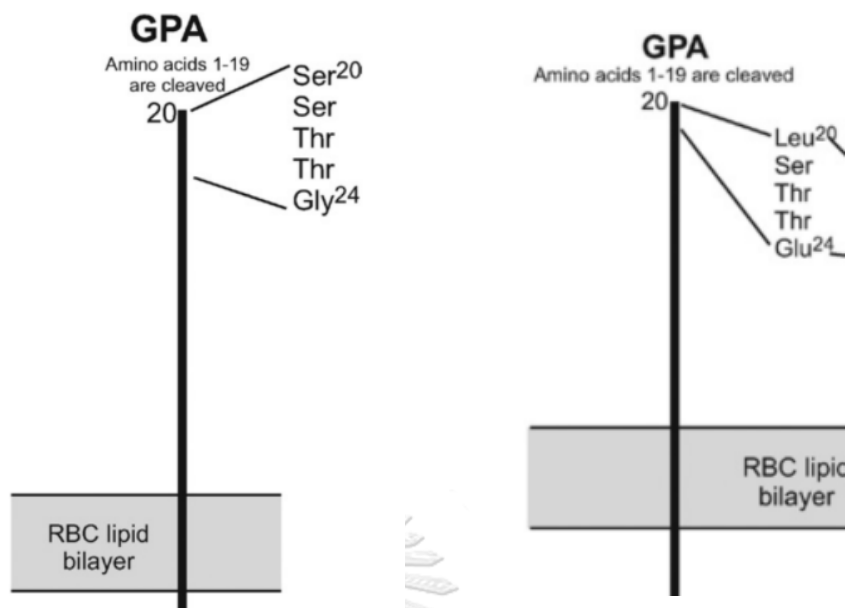
รูปภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของ *glycophorin A (GPA)* และ *glycophorin B (GPB)*

ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจนในหมู่โลหิตระบบ MNS ได้แก่ *GYP*A*, *GYP*B* และ *GYP*E* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 (4q31.21) ยีน *GYP*A* ประกอบด้วย 7 exons มีความยาว 60 kbp สร้างแอนติเจนที่สำคัญได้แก่ M และ N ยีน *GYP*B* ประกอบด้วย 6 exons มีความยาว 58 kbp และมี 1 pseudo exon ที่ exon ลำดับที่ 3 สร้างแอนติเจนที่สำคัญได้แก่ S และ s สำหรับยีน *GYP*E* ประกอบด้วย 6 exons และมี pseudo exon ที่ exon ลำดับที่ 3 และ 4 ซึ่งตามปกติ *GYP*E* จะไม่แสดงออกบนผิวเม็ดโลหิตแดง ยกเว้นเมื่อมีการจัดเรียงยีนรูปแบบใหม่และเกิด variant ของยีน *GYP*E* โดยทั้ง 3 ยีนนี้มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 95(4) การที่ยีนที่เกี่ยวข้องมีความใกล้เคียงกันมากและอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมได้สูง ปัจจุบัน มีการพบแอนติเจนที่บรรจุอยู่ในระบบ MNS จำนวน 50 แอนติเจน(5) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงแอนติเจนที่อยู่ในระบบ MNS (ISBT blood group antigens v.9.0)

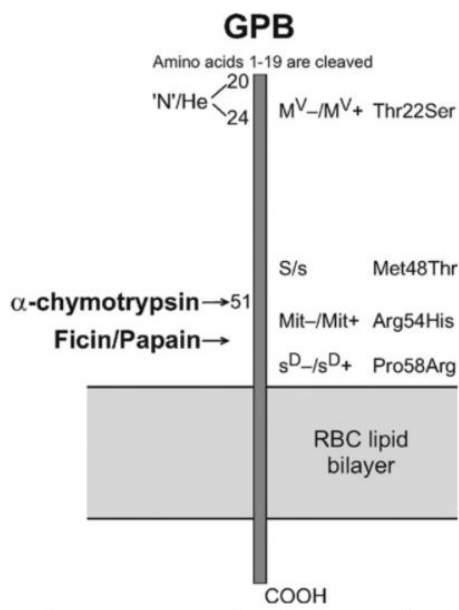
System	Antigen number									
002 MNS	001	002	003	004	005	006	007	008	009	010
	M	N	S	s	U	He	Mi ^a	Mc	Vw	Mur
	011	012	013	014	015	016	017	018	019	020
	M ^s	Vr	M ^e	Mt ^a	St ^a	Ri ^a	Cl ^a	Ny ^a	Hut	Hil
	021	022	023	024	025	026	027	028	029	030
	M ^v	Far	s ^D	Mit	Dantu	Hop	Nob	En ^a	ENKT	'N'
	031	032	033	034	035	036	037	038	039	040
	Or	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	Os ^a	ENEP	ENEH
	041	042	043	044	045	046	047	048	049	050
	HAG	ENAV	MARS	ENDA	ENEV	MNTD	SARA	KIP	JENU	SUMI

แอนติเจน M และ N เป็นแอนติเจนที่อยู่บน GPA ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1927 จัดเป็นแอนติเจนลำดับที่ 1 และ 2 ที่ถูกค้นพบในหมู่โลหิตระบบ MNS ซึ่งแอนติเจน M และ N เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส 1 ตำแหน่ง (SNPs) ในตำแหน่ง exon ที่ 2 ของยีน *GYP*^A* ได้แก่ ตำแหน่งที่ 59 จาก C>T, ตำแหน่งที่ 71 จาก G>A และ ตำแหน่งที่ 72 จาก T>G ทำให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Serine และ glycine (แอนติเจน M) เป็น Leucine และ Glutamic acid (แอนติเจน N) แอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้ง 2 มักเป็นชนิด IgM และมีความสำคัญทางคลินิกน้อย มีรายงานผู้ป่วยเพียงเล็กน้อยที่ทำให้เกิดอาการหลังรับโลหิตและภาวะซีดของทารกแรกคลอดจาก anti-M(6)



รูปภาพที่ 4 แสดง GPA ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกของแอนติเจน M (ซ้าย) N (ขวา)

แอนติเจน S และ s เป็นแอนติเจนที่อยู่บน GPB ถูกค้นพบถัดจากแอนติเจน M และ N จัดเป็นแอนติเจนลำดับที่ 3 และ 4 ในหมู่โลหิตระบบ MNS ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส 1 ตำแหน่ง (SNPs) ใน exon ที่ 4 ของยีน *GYP*B* ที่ตำแหน่ง 143 จาก T>C ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Methionine (แอนติเจน S) เป็น Threonine (แอนติเจน s) โดยทั่วไปแอนติเจน s- จะพบได้ในคนผิวดำสูงกว่าเชื้อชาติอื่นๆ แอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้ง 2 มักเป็นชนิด IgG มีความสำคัญทางคลินิกและจำเป็นต้องจัดหาโลหิตที่ไม่มีแอนติเจนให้กับผู้ป่วย(6)



รูปภาพที่ 5 แสดง GPB ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกของแอนติเจน S และ s

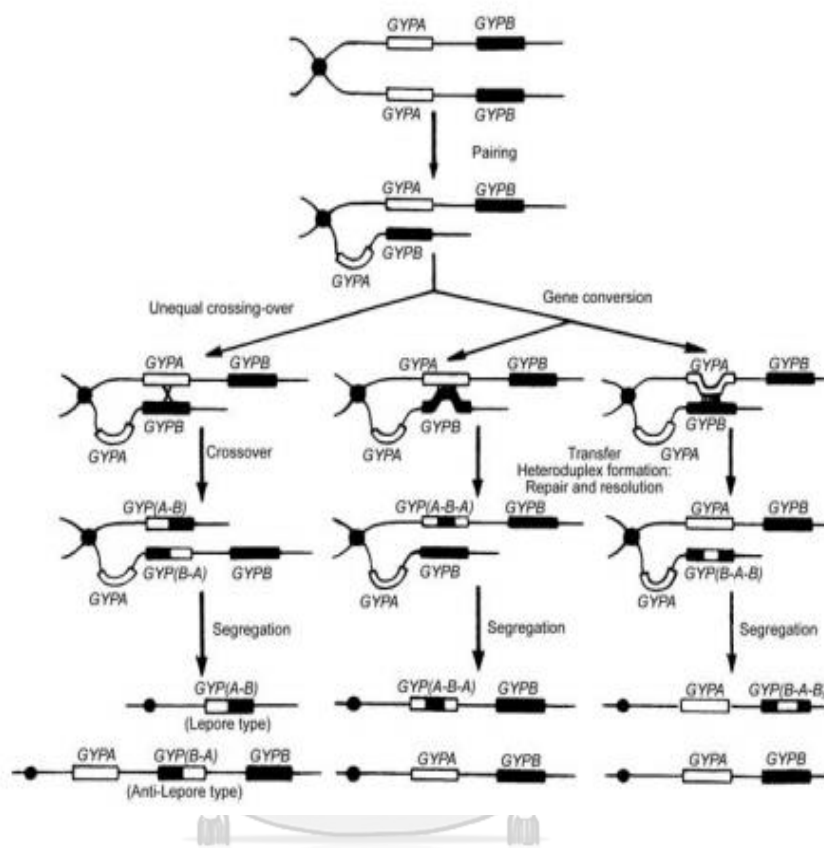
การเกิดแอนติเจนใหม่และแอนติเจนที่แตกต่างกันบนเม็ดโลหิตแดงในระบบหมู่โลหิต MNS เกิดได้จาก 3 สาเหตุ(6)

(1) การเกิด Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) เช่น แอนติเจน M เปลี่ยนเป็นแอนติเจน N เกิดการเปลี่ยนแปลงของ *GYP*A* ที่ตำแหน่ง 59 จาก C เป็น T ตำแหน่ง 71 จาก G เป็น A และ ตำแหน่ง 72 จาก T เป็น G ทำให้โปรตีนเปลี่ยนจาก Serine เป็น Leucine ในตำแหน่งที่ 20 และ Glycine เป็น Glutamic acid ในตำแหน่งที่ 24 เป็นต้น

(2) การขาดหายไปของยีน เช่น การขาดหายไปของยีน *GYP*A* ทำให้เกิดแอนติเจน En(a-) การขาดหายไปของ *GYP*B* ทำให้เกิดแอนติเจน U- และการขาดหายไปของ *GYP*A* และ *GYP*B* ทำให้เกิดแอนติเจน MkMk

(3) ยีน *GYP*A* และ *GYP*B* เกิดการแลกเปลี่ยนยีนแบบ unequal crossing over หรือ gene conversion และเป็นการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนที่เป็นคู่กัน (homologous gene) ทำให้เกิดยีน hybrid glycophorin 4 แบบ คือ *GYP*(A-B)*, *GYP*(B-A)* และ *GYP*(A-B-A)*, *GYP*(B-A-B)* ดัง

แสดงในรูปภาพที่ 6 ยีน hybrid เหล่านี้ จะสร้างโปรตีน glycoprotein (GP) ที่หลากหลายเกิดเป็นแอนติเจนในหมู่โลหิต MNS เช่น GP.Mur, GP. Hil เป็นต้น



รูปภาพที่ 6 แสดงกลไกการเกิด unequal crossing over และ gene conversion ทำให้เกิด GYP*(A-B), GYP*(B-A), GYP*(A-B-A) และ GYP*(B-A-B)(23)

2.1.3 Hybrid glycoprotein

Hybrid glycoprotein เกิดจากการแลกเปลี่ยนยีนแบบ unequal crossing over และ gene conversion ระหว่างยีน GYP*A และ GYP*B โดยเป็นการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนที่เป็นคู่กัน (homologous gene) เกิดยีน hybrid ได้แก่ GYP*(A-B), GYP*(B-A) และ GYP*(A-B-A), GYP*(B-A-B) ซึ่งขนาดของยีนและตำแหน่งของยีนที่แลกเปลี่ยนนั้น มีผลทำให้เกิดโปรตีน (hybrid glycoprotein) ที่แตกต่างกัน 4 กลุ่ม คือ GP(A-B), GP(B-A), GP(A-B-A) และ GP(B-A-B) และ

hybrid glycoporphins เหล่านี้ ทำให้เกิดการแสดงออกของ glycoporphin phenotypes 14 ชนิด ที่มีแอนติเจนในกลุ่ม low incidence antigens หลายชนิดที่แตกต่างกันของหมู่โลหิตระบบ MNS ได้แก่ GP(A-B) แสดงออกเป็น GP.Hil, GP.JL, GP(B-A) แสดงออกเป็น GP.Sch, GP.Dantu, GP(A-B-A) แสดงออกเป็น GP.Vw, GP.Hut, GP.Nob, GP.Joh, GP.Dane และ GP(B-A-B) แสดงออกเป็น GP.Mur, GP.Hop, GP.Bun, GP.HF และ GP.Kip โดย hybrid glycoporphin แต่ละชนิด จะประกอบด้วย low incidence antigens ที่จำเพาะหลายชนิด และ แอนติเจนเหล่านี้บางชนิด อาจจะมีพบได้บน GP ชนิดอื่นด้วย เช่น GP.Mur มีแอนติเจน Mi^a, MUR, MUT, Hil และ MINY ซึ่งแอนติเจน Mi^a จะพบใน GP.Vw, GP.Hut, GP. Mur, GP.Hop, GP.Bun, GP.HF ด้วย เป็นต้น(4) ในอดีต hybrid glycoporphin (GP) กลุ่มนี้ถูกรวมเรียกว่า Miltenberger subsystem (Mi) โดยจัดเป็น Mi.I ถึง Mi.XI และมีการพบแอนติเจนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจัดเป็นแอนติเจนในกลุ่ม Low- incidence antigens จำนวน 14 ชนิด การระบุว่า GP ชนิดใด ดูจากผลการทำปฏิกิริยาของ specific antisera 14 ชนิด กับเม็ดเลือดแดงที่มี low incidence antigens ต่างๆที่พบในขณะนั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง hybrid glycoporphin (GP) 14 ชนิด และปฏิกิริยาที่ antisera ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนต่างๆที่เกี่ยวข้องจำนวน 14 แอนติเจน(3)

Table 1
Glycoporphin variant phenotypes and their associated antigens

Terminology	Reaction of RBCs with antiserum to the following antigens													
	Mi ^a (MNS7)	Vw (MNS9)	Hut (MNS19)	Mur (MNS10)	MUT (MNS35)	Hil (MNS20)	TSEN (MNS33)	MINY (MNS34)	Hop (MNS26)	Nob (MNS27)	DANE (MNS32)	St ^a (MNS15)	Dantu (MNS25)	KIPP (MNS48)
GP (A-B)														
GP.Hil	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0
GP.JL	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
GP (B-A)														
GP.Sch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
GP.Dantu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
GP (A-B-A)														
GP.Vw	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GP.Hut	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GP.Nob	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
GP.Joh	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0
GP.Dane	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
GP (B-A-B)														
GP.Mur	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0
GP.Hop	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0
GP.Bun	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0
GP.HF	+	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0
GP.Kipf	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	0	+

Note: Agglutination (+, positive); No agglutination (0, negative); [Lopez et al. [10] and Green et al. [11]. Table based on Lomas-Francis [12].

เมื่อมีการศึกษาในระดับโมเลกุล พบว่าแอนติเจนกลุ่มนี้ เป็น variant antigens ของหมู่โลหิต MNS อีกทั้งยังมีการพบยีน hybrid glycoporphin และ พบแอนติเจนใหม่ที่เกี่ยวข้อเพิ่มขึ้นอีกเรื่อยๆ จึงให้ยกเลิกการเรียกชื่อ Miltenberger subsystem (Mi) เป็น glycoporphin (GP) แทน ดังแสดงในรูปภาพที่ 7

Hybrid allele	Glycophorin	Phenotype symbol	Associated novel antigens
<i>GYP(A-B)</i>	GP(A-B)	GP.Hil (Mi.V) GP.JL (Mi.XI) GP.TK	Hil, MINY TSEN, MINY SAT
<i>GYP(B-A)</i>	GP(B-A)	GP.Sch (M ¹) GP.Dantu	St ^a Dantu
<i>GYP(A-B-A)</i>	GP(A-B-A)	GP.Mg GP.KI	M ⁸ , DANE Hil
<i>GYP(B-A-B)</i>	GP(B-A-B)	GP.Mur (Mi.III) GP.Bun (Mi.VI) GP.HF (Mi.X) GP.Hop (Mi.IV)	Mi ^a , Mur, MUT, Hil, MINY Mi ^a , Mur, MUT, Hop, Hil, MINY Mi ^a , MUT, Hil, MINY Mi ^a , Mur, MUT, Hop, TSEN, MINY
	GP(A-B)	GP.He; (P2, GL)	He
<i>GYP(B-A-ψB-A)</i>	GP(A-A)	GP.Cal	He, St ^a
<i>GYP(A-ψB-A)</i>	GP(A-B-A)	GP.Vw (Mi.I) GP.Hut (Mi.II) GP.Nob (Mi.VII) GP.Joh (Mi.VIII) GP.Dane (Mi.IX)	Mi ^a , Vw Mi ^a , Hut, MUT Nob Nob, Hop Mur, DANE
	GP(A-A)	GP.Zan (M ²)	St ^a
<i>GYP A 179G>A</i>	GPA	GP.EBH	ERIK (from transcript 1)
	GP(A-A)	GP.EBH	St ^a (from transcript 2)
<i>GYP(A-ψE-A)</i>	GPA-A	GP.Mar	St ^a

รูปภาพที่ 7 แสดงยีน hybrid glycoporphin ชนิดต่างๆ ที่ทำให้เกิดรูปแบบ glycoporphin (GP) หรือ Mi ที่แตกต่างกัน และแอนติเจนต่างๆที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจัดเป็น low- incidence antigens(6)

2.1.4 hybrid glycoporphin (B-A-B)

เกิดจากการ gene conversion ของ *GYP*A* และ *GYP*B* ทำให้มีบางส่วนของยีน *GYP*A* สอดแทรก (insert) เข้าไปอยู่ในส่วนของยีน *GYP*B* เกิดเป็นยีน *GYP*(B-A-B)* ขบวนการนี้ทำให้ *GYP*B* pseudo exon 3 ซึ่งปกติไม่แสดงออก เกิดการแสดงออก และสร้างโปรตีน GP

phenotypes ใหม่ ที่มี low incidence antigens ต่างๆของหมู่โลหิต MNS ซึ่งพบแล้ว 5 GP phenotypes แยกตามความยาวของยีน *GYP*A* และตำแหน่งที่สอดแทรกเข้าสู่ยีน *GYP*B* ได้แก่ GP.Mur (ยีน *GYP*A* จำนวน 55 bp แทรกที่ตำแหน่ง *GYP*B* 5' ของ pseudoexon 3), GP.Hop (ยีน *GYP*A* จำนวน 131 bp แทรกที่ตำแหน่ง *GYP*B* 5' ของ pseudoexon 3), GP.Bun (ยีน *GYP*A* จำนวน 131 bp แทรกที่ตำแหน่ง *GYP*B* 5' ของ pseudoexon 3), GP.HF (ยีน *GYP*A* จำนวน 98 bp แทรกที่ตำแหน่ง *GYP*B* 5' ของ pseudoexon 3) และ GP.Kip (ยีน *GYP*A* จำนวน 35 bp แทรกที่ตำแหน่ง 3' intron)(4, 6, 24) โดยการแสดงออกของ *GYP*B* pseudo exon 3 มีผลให้ลำดับกรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลง และส่งผลต่อลำดับโปรตีนที่สร้างขึ้นเป็นแอนติเจนของหมู่โลหิต เช่น กรดอะมิโนของ GP.Mur กับ GP.Bun มีความต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 57 ซึ่ง GP.Mur เป็น arginine แต่ GP.Bun เป็น Threonine ขณะที่ GP.HF มีกรดอะมิโนแตกต่างจาก GP.Mur 5 amino acid และแตกต่างจาก GP.Bun 6 amino acid เท่านั้น ดังแสดงในรูปภาพที่ 8(25) ทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับโลหิต มีโอกาสสร้างแอนติบอดีต่อลำดับโปรตีน ที่เปลี่ยนแปลงนี้ได้

GP.Mur	SSQTNDKHKRDTPA- HTANEVSEI SVRTVYPPPEETGETGQLVHRFTVP
GP.Hop	SSQTNDKHKRDTPA- HTANEVSEI SVTTVYPPPEETGEMGQLVHRFTVP
GP.Bun	SSQTNDKHKRDTPA- HTANEVSEI SVTTVYPPPEETGETGQLVHRFTVP
GP.Kip	SSQTNDKHKRDTPA- HTANEVSEI SVTTVSPPEETGETGQLVHRFTVP
GP.HF	SSQTNDKHKRDTYAAT PRAHEVSEI SVRTVYPPPEETGETGQLVHRFTVP

รูปภาพที่ 8 แสดงลำดับโปรตีนที่แตกต่างของแต่ละ Glycophorin

เนื่องจากแอนติเจน M, N, S และ s อยู่บน GPA และ GPB ทำให้การแลกเปลี่ยนยีนส่วนยีนนี้ ส่งผลต่อการแสดงออกของแอนติเจน M, N, S และ s เช่นกัน โดย GP.Mur และ GP.Bun จะมีลักษณะ phenotype เหมือนกัน คือมีการแสดงแอนติเจน Mur, Hill, MINY และ MUT แต่ต่างกันว่า GP.Bun มีแอนติเจน Hop ด้วย อีกทั้ง GP.Mur และ GP.Bun จะแสดงออกพร้อมกับแอนติเจน s เสมอ ในคนไทยและคนจีนโดยทั่วไป GP.Mur จะแสดงออกพร้อมกับแอนติเจน Ms และแอนติเจน s ที่เกี่ยวข้องกับ GP.Mur อาจมีผลไม่ปกติกับน้ำยา anti-s โดยบางรายเกิดปฏิกิริยาแรงมาก บางรายอ่อน ส่วน GP.Hop จะมีลักษณะ phenotype เหมือน GP.Bun คือมีการแสดงแอนติเจน Mur, Hop, MINY และ MUT ต่างกันว่า GP.Hop มีแอนติเจน TSEN ไม่มีแอนติเจน Hil อีกทั้ง allele *GYP*Hop* จะสร้างแอนติเจน S แต่ allele *GYP*Bun* จะสร้างแอนติเจน s เสมอ ในขณะที่ GP.HF จะพบ

แอนติเจน เป็น M+ และ s+ ที่มีความแรงมากกว่าปกติเสมอ และมีการแสดงออกของแอนติเจน Hill, MINY และ MUT โดย low incidence antigens ที่เกี่ยวข้องกับ hybrid glycoprotein (B-A-B) แต่ ละชนิด แสดงในตารางที่ 3(3)

ตารางที่ 3 แสดง allele phenotype และแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับ hybrid glycoprotein (B-A-B)

Allele	Glycophorin encoded	Phenotype	Associated low-prevalence antigen(s)
<i>GYP*(B-A-B)</i> ได้แก่ <i>GYP*Mur, GYP*Bun,</i> <i>GYP*HF, GYP*Hop</i>	GP(B-A-B)	GP.Mur	Mi ^a , Mur, Hil, MINY, MUT
		GP.Bun	Mi ^a , Mur, Hil, Hop, MINY, MUT
		GP.HF	Mi ^a , Hil, MINY, MUT
		GP.Hop	Mi ^a , Mur, Hop, TSEN, MINY, MUT (S+)

จากรายงานของ Palacajornsuk P และคณะ(23) แสดงข้อมูลให้เห็นว่า GP.Mur เป็น hybrid glycoprotein ที่พบได้มากที่สุดในประเทศชาวเอเชียและมากกว่าชาวตะวันตก โดยในประเทศชาวไทยพบ GP.Mur มากที่สุดและพบความถี่สูงเมื่อเทียบกับประเทศชาวจีนและชาวไต้หวัน ดังแสดงในตารางที่ 4(24)

ตารางที่ 4 แสดงความถี่ของ glycoprotein จากการศึกษานี้ในแต่ละประเทศและเทคนิคที่แตกต่าง

Regions	Number of subjects	Prevalence (%)	Genotyping method(s)
China	3104	6.31 (GP.Mur) 0.03 (GP.Mur/GP.Sch) 0.06 (GP.Bun) 0.03 (GP.HF) 0.03 (Novel <i>GYP (B-A-B)</i> hybrid allele)	PCR/HRM/MLPA
China	275	5.50 (GP.Mur)	LAMP
China	528	9.50 (GP.Mur) 0.20 (Novel GP.Bun)	PCR/MLPA
Thailand	143	32.86 (GP.Mur) 2.09 (GP.Hop/GP.Bun)	qPCR/PCR
Taiwan	1027	5.60 (GP.Mur) 3.40 (St ^a variants)	PCR
Taiwan	379	20.32 (GP.Mur)	Direct blood PCR/HRM
China	91	6.59 (GP.Mur)	PCR/MLPA
Thailand	1041	7.97 (GP.Mur) 1.06 (GP.Bun)	PCR-SSP
Taiwan	264	4.92 (GP.Mur) 0.40 (GP.Hil) 3.03 (St ^a variant)	PCR-RFLP

ต่อมา Palacajornsuk P และคณะ(23) ทำการศึกษา hybrid glycoephorin: GP(B-A-B) ในประชากรชาวไทยในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่อยู่ในภาคกลาง และทางภาคเหนือของประเทศ พบว่า ประชากรภาคเหนือ พบความถี่ของGP(B-A-B) มากกว่าคนภาคกลาง ทั้งนี้ผู้วิจัยสันนิษฐานว่า อาจเกิดจากสิ่งแวดล้อม เนื่องจากพบว่า hybrid glycoephorin มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความทนต่อ เชื้อมาลาเรีย(3) ซึ่งพบว่าความชุกของเชื้อมาลาเรียในภาคเหนือของไทยสูงกว่าภาคกลาง จึงอาจเป็น สาเหตุที่ทำให้ความถี่ของ hybrid glycoephorin ในประชากรคนไทยภาคเหนือสูงกว่าภาคกลางดัง แสดงในตารางที่ 5(26)

ตารางที่ 5 แสดงการศึกษาความถี่ของ glycoephorin ในคนไทย เปรียบเทียบระหว่างภูมิภาคเหนือ และกลาง*

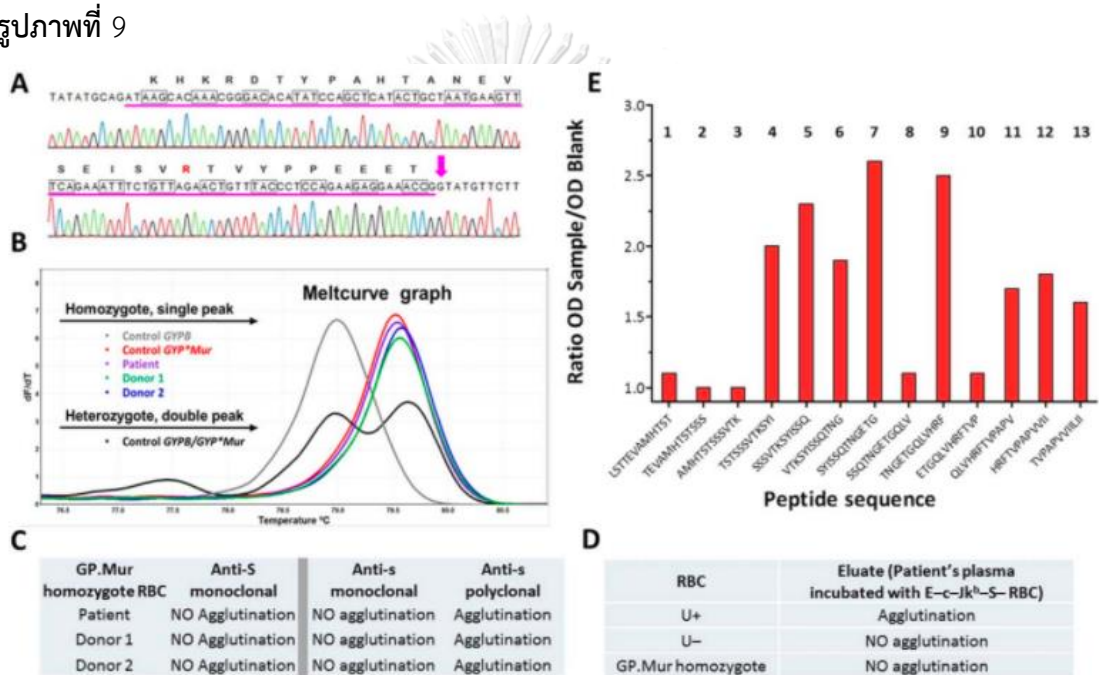
Genotype	Predicted phenotype	Central Thai		Northern Thai	
		Number	%	Number	%
<i>GYP*Hut, GYP*Mur, GYP*Hop, GYP*Bun, GYP*HF</i>	GP.Hut, GP.Mur, GP.Hop, GP.Bun, GP.HF positive	28/300	9.3	67/300	22.3
	GP.Hut, GP.Mur, GP.Hop, GP.Bun, GP.HF negative	272/300	90.7	233/300	77.7

*ดัดแปลงจากตารางต้นฉบับ

2.1.5 แอนติเจน JENU

การประกาศแอนติเจนชนิดใหม่ตามหลักการขององค์กร ISBT จะต้องมีความสมบัติในการ กระตุ้นสร้าง alloantibody ที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้นได้ โดยแอนติบอดีต่อแอนติเจน JENU ค้นพบ ครั้งแรกในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชาวไทยที่สร้างแอนติบอดีต่อ high - incidence antigen หลังจากการ รับโลหิต 2 ยูนิต แอนติบอดีนี้ทำปฏิกิริยากับ screening cells ที่ Indirect antiglobulin phase (IAT) เมื่อทดสอบความเข้ากันได้กับโลหิตบริจาคจำนวน 3,600 ราย พบเข้ากันได้ 2 ราย ผู้บริจาค โลหิต 2 รายนี้และผู้ป่วยมีผลการตรวจแอนติเจน s เป็นผลลบปลอมกับน้ำยา anti-s monoclonal

IgM clone P3BER เมื่อศึกษาระดับอนุชีววิทยาด้วยเทคนิค Sanger sequencing ที่ลำดับเบสจำเพาะที่ exon 2 – 4 ของยีน *GYP*B* และศึกษารูปแบบ zygosity ด้วย PCR HRM พบมีรูปแบบพันธุกรรมเป็น homozygous *GYP*Mur* เมื่อทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา มีการแสดงออกของแอนติเจน Mi², Mur, MUT และ Hil ซึ่งตรงกับลักษณะของ GP.Mur และทดสอบยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดี โดยทำการ adsorp ด้วยเซลล์ที่มีแอนติเจนตรงกับผู้ป่วยและ elute แอนติบอดีต่อ high – incidence antigen นำมาทดสอบกับเซลล์ U+ และ U- พบว่า eluate ทำปฏิกิริยากับเซลล์ U+ และไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ U- บ่งบอกว่าแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะกับ GPB ผลการศึกษา ดังรูปภาพที่ 9

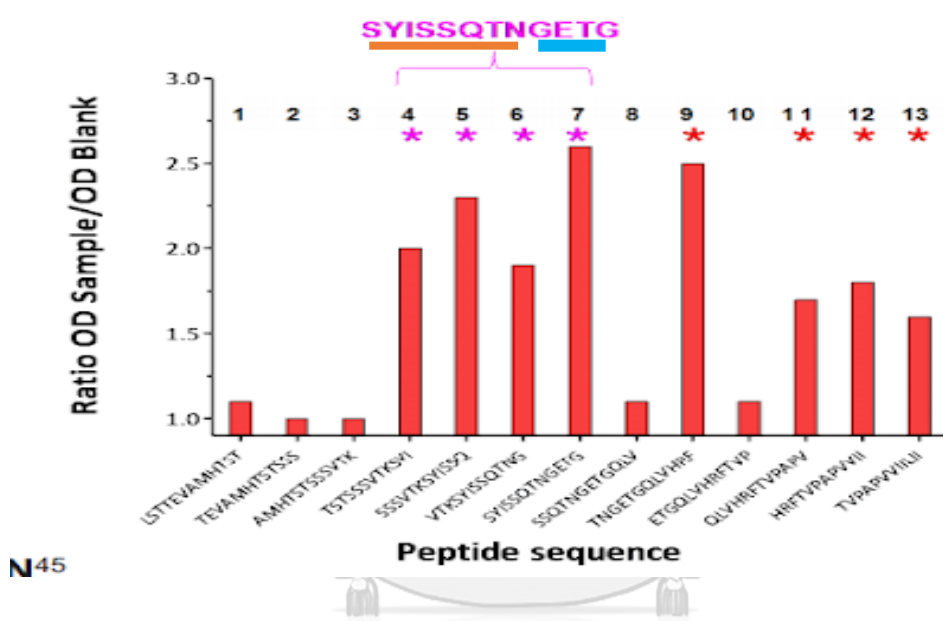


รูปภาพที่ 9 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างผู้ป่วยและผู้บริจาค JENU

(A) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *GYP*Mur* (B) แสดงการวิเคราะห์ PCR HRM ได้ผล melting curve graph เป็น curve เดียว แสดงว่าเป็น homozygous ซึ่งลักษณะของ graph ตรงกับ *GYP*Mur* (C) แสดงผลการทดสอบ serology S/s (D) แสดงผลการตรวจยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดีจากการทำ adsorption-elution (E) แสดงลำดับโปรตีนที่จำเพาะกับน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER(19)

สาเหตุที่แอนติเจน JENU ทำปฏิกิริยากับน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER ให้ผลลบปลอม เกิดจาก ยีน *GYP*A* แทรกเข้ามาในยีน *GYP*B* ทำให้ pseudo exon 3 ซึ่งปกติจะไม่

แสดงออก เกิดการแสดงออก ทำให้สร้างลำดับโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป น้ำยา anti-s monoclonal จะมีความจำเพาะต่อลำดับโปรตีน SYISSQTNGETG ที่แสดงออกจากนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสจาก exon 2 และ 4 ซึ่ง GP.Mur ลำดับโปรตีนส่วนนี้จะหายไปเนื่องจากถูกแทรกด้วย exon 3 ที่แสดงออกมา จึงให้ผลลกับน้ำยา anti-s monoclonal ส่วนน้ำยา anti-s polyclonal จะมีความจำเพาะกับโปรตีนหลายส่วน จะทำปฏิกิริยาให้ผลบวกกับชุดโปรตีนที่ 9 และที่ 11 ถึง 13 ดังแสดงในรูปภาพที่ 10



รูปภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งลำดับโปรตีนที่จำเพาะของน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER และ polyclonal IgG

2.1.6 แอนติบอดีต่อแอนติเจนของ hybrid glycoprotein

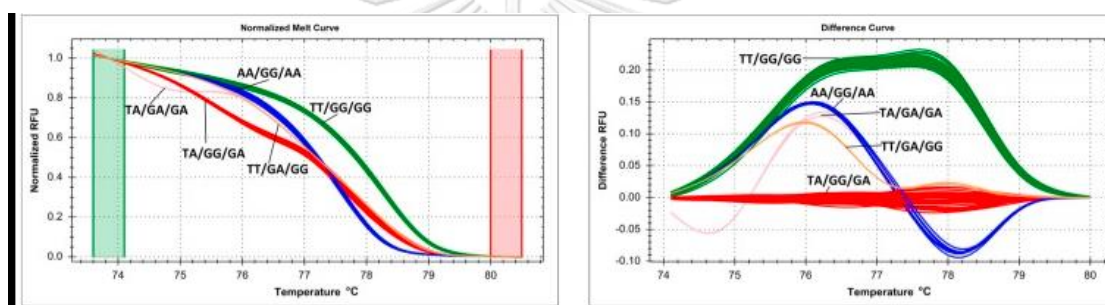
แอนติบอดีต่อแอนติเจนในหมู่โลหิตระบบ MNS สามารถเกิดได้ตามธรรมชาติ เป็น IgM แอนติบอดี หรือเกิดการกระตุ้นจากการรับโลหิตหรือตั้งครรภ์เป็นแอนติบอดีชนิด IgG มีความสำคัญทางคลินิกแตกต่างกัน ตั้งแต่อาการไม่รุนแรง จนเกิดอาการรุนแรงได้ เช่น anti-M, anti- N anti-S, anti-s เป็นต้น

แอนติบอดีต่อ hybrid glycoporphin เป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในชาวเอเชียตะวันออก เช่น anti- Mi^a , anti-Vw, anti-Hil, anti-Hut, และ anti-Mur เป็นสาเหตุทำให้เกิด hemolytic disease of fetus and newborn (HDFN) และ hemolytic transfusion reaction (HTR) alloantibodies เหล่านี้สามารถสร้างในคนที่ไม่มี low incidence antigens บางตัวใน hybrid glycoporphin บางชนิด ซึ่งแอนติเจนในกลุ่มนี้แต่ละชนิด มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ ตรวจพบทั้งในผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต แต่การตรวจแยกแอนติเจนจำเพาะแต่ละชนิดทำไม่ได้ ด้วยข้อจำกัดที่แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อแอนติเจนแต่ละชนิดหายาก ไม่มีขายในท้องตลาด แอนติบอดีที่พบในกลุ่มนี้เรียกรวมว่า anti-Mi^a เม็ดเลือดแดงที่ทำปฏิกิริยากับ anti-Mi^a แล้วให้ผลบวกแสดงว่ามีแอนติเจน Mi^a บวก และใช้เซลล์นี้เป็น screening และ identification cells เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนต่างๆในกลุ่มนี้

ดังได้กล่าวมาข้างต้น GP(B-A-B) พบได้น้อยมากในกลุ่มคนผิวขาว น้อยกว่าร้อยละ 0.01 แต่จะพบมากในประชากรเชื้อสายเอเชีย โดยจะพบ GP.Mur มากที่สุด ซึ่งจะมีการแสดงออกของ low incidence antigens 5 แอนติเจน ได้แก่ Mi^a, Mur, Hil, MINY และ MUT การได้รับโลหิตที่มีแอนติเจนเหล่านี้ สามารถกระตุ้นให้ผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีได้ ที่พบบ่อยคือ anti- Mi^a, anti-MUT, anti-Mur และ anti-Hil ส่วน anti-MINY ยังไม่มีรายงานว่าผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนนี้(3) ในประเทศไทย แอนติบอดีต่อกลุ่ม GP(B-A-B) พบได้ทั้งในผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต มีทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และจากการรับโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ รายงานการพบ anti- Mi^a ในผู้บริจาคโลหิตร้อยละ 6.97(8) และ ในผู้ป่วยร้อยละ 41.3(14) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบ anti-Hop ในผู้ป่วยไทย ซึ่งให้ผลบวกกับ screen cells ที่ Mi(a+) บางเซลล์ ที่มี Hop(+) ด้วย (GP.Bun)(12) พบ anti-Hil ในผู้ป่วยไทยซึ่งให้ผลบวกกับเซลล์ที่มีแอนติเจน Mi (a+) และ Hil(+)(13) และในปี ค.ศ. 2018 พบ anti-JENU ในผู้ป่วยธสีเมียชาวไทย โดยมีแอนติเจน Mi(a+) ตรวจพบมียีน homozygous *GYP*Mur* ทำให้ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติบนผิวเม็ดเลือดแดง เป็นแอนติเจน JENU- เมื่อได้รับเลือดที่มี JENU+ ซึ่งเป็น high incidence antigens ของ hybrid glycoporphin กลุ่มนี้ (GPB ปกติ) จึงกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีได้ ทำให้เกิดปัญหาในการหาโลหิตให้กับผู้ป่วย(19)

2.1.7 เทคนิค high resolution assay (HRM)

High resolution melting (HRM) เป็นวิธีการที่นิยมเพื่อใช้ศึกษา multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) เป็นวิธีที่ทำการทดสอบได้ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก และมีน้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัท มีความไวและความจำเพาะสูง โดยวิธีนี้ อาศัยหลักการเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตำแหน่ง จะทำให้เกิด T_m ที่เปลี่ยนแปลงไป (อุณหภูมิที่ใช้แยกสาย DNA เป็นสายเดี่ยวได้ร้อยละ 50 คำนวณได้จาก $T_m = 4(G+C)+2(A+T)$) และเกิด melting curve ที่รูปร่างเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งวัดได้จากการใช้สี Evagreen หรือ SYTO9 ที่เรืองแสงเมื่อสาย DNA เป็น double strand และเรืองแสงลดลงเมื่อ DNA เปลี่ยนเป็น single strand เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิ ดังรูปภาพที่ 11(27)



รูปภาพที่ 11 ตัวอย่างการทดสอบยีน FTO โดยใช้เทคนิค HRM ที่ตำแหน่ง $c.46-23525T>A$ ($rs9939609$), $c.46-23540G>A$ ($rs76804286$) และ $c.46-23549G>A$ ($rs9926289$)

เมื่อมีรูปแบบทางพันธุกรรมแตกต่างกันจะให้รูปแบบ melting curve graph แตกต่างกัน และเมื่อ software คำนวณค่า T_m ที่ทำให้ DNA แยกเป็น single strand จะให้ค่า T_m ที่แตกต่างกันด้วย(27)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลการทดลอง (27) ได้แก่

- 1) แหล่งของ DNA ที่นำมาทดสอบ การสกัด DNA จากแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน จะให้ผลที่แตกต่างกันได้ เช่น ชิ้นเนื้อและเม็ดโลหิตขาว เนื่องจากชิ้นเนื้อที่แช่ในสารละลายที่แตกต่างกัน เช่น formalin-fixed หรือ paraffin-embedded (FFPE) จะส่งผลต่อค่า pH และเกลือของ DNA ถึงแม้ว่าจะมีการใส่ buffer เพื่อปรับ pH ภายหลังการสกัดก็

ตาม ในขณะที่จากเม็ดเลือดขาวที่ได้จากเลือดเต็มส่วนจะไม่มีสารเติมสาร fixed ใดๆ ดังนั้น ในการทดลองที่ต้องเปรียบเทียบค่า T_m ควรสกัด DNA มาจากแหล่งเดียวกัน เพื่อให้ได้ผลที่น่าเชื่อถือ

- 2) วิธีการสกัด DNA การสกัดโดยเครื่องตรวจอัตโนมัติ ให้ผลที่คงที่มากกว่าการสกัดโดย manual
- 3) ความเข้มข้นของ DNA ความเข้มข้นของ DNA ที่ได้ มีผลต่อความสูงของ curve และพื้นที่ใต้ curve ดังนั้น วิธี HRM จำเป็นจะต้องปรับความเข้มข้นของ DNA ตั้งต้นให้เท่ากันทุกตัวอย่างก่อนการทดสอบ
- 4) การออกแบบ primers เพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่งที่ต้องการศึกษาและไม่ให้ PCR product ที่ยาวมากเกินไป ทั้งนี้ ยิ่ง PCR product ยาว ยิ่งมีโอกาสที่จะตรวจพบตำแหน่ง variant อื่นๆ ที่ไม่ต้องการ และรบกวนค่า T_m ได้
- 5) เครื่อง thermocycler ที่ใช้ ต้องมีโปรแกรม HRM analysis ความไวของเครื่อง thermocycler และโปรแกรมที่จำเพาะ จะทำให้ผลที่ได้แตกต่างกันในแต่ละรุ่นของเครื่อง ดังนั้น การทดลองที่ต้องเปรียบเทียบผลต้องใช้เครื่อง thermocycler เครื่องเดียวกันเสมอ
- 6) การใช้ pipette เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ดังนั้นปริมาตรที่แตกต่างเล็กน้อยจะส่งผลต่อรูปร่าง curve ที่ได้ การใช้เครื่องดูดปล่อยสารอัตโนมัติ (automated pipette) จะให้ผลที่คงตัวมากกว่า
- 7) รูปแบบของ variants ที่จะตรวจวัด จากการคำนวณค่า $T_m = 4(G+C)+2(A+T)$ จะเห็นว่า T_m ที่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนเบส ซึ่งหาก variant ที่ต้องการตรวจนั้นเป็น homologous base กัน ได้แก่ C,G และ A,T อาจไม่สามารถใช้เทคนิคนี้ในการแยก T_m ได้ เนื่องจากจำนวนพันธะของเบสที่เปลี่ยนแปลงนั้นไม่แตกต่างกัน ส่งผลให้ค่า T_m ที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง แม้จะมี variant เกิดขึ้น

2.1.8 เทคนิค Sanger sequencing

การนำเทคนิค Sanger DNA sequencing หรือ Dideoxy chain termination method มาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1975 จัดเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการหาลำดับเบสของสารพันธุกรรม ซึ่งจัดเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยทางการแพทย์มีความสำคัญในการระบุเชื้ออุบัติใหม่และดูความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของเชื้อเพื่อประเมินการรักษาและป้องกัน ความสำคัญของการหาลำดับเบสในงานเวชศาสตร์ธนาการเลือดคือเพื่อการระบุแอนติเจนใหม่ ทั้งแอนติเจนบนเม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือดและเม็ดเลือดแดง เพื่อการให้ส่วนประกอบโลหิตและการปลูกถ่ายอวัยวะมีความปลอดภัยรวมถึงการระบุแอนติเจนที่ค้นพบแล้วและมีข้อจำกัดในการศึกษาด้วยน้ำเหลืองวิทยา(28)

ขั้นตอนการทำ Sanger sequencing คือเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมก่อนและใช้ ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) มีความคล้ายคลึงกับ dNTP ทั่วไปแต่แตกต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จะมี H แทนที่ OH ซึ่งคุณสมบัตินี้ทำให้ไม่สามารถเกิดพันธะ phosphodiester bond กับนิวคลีโอไทด์ตัวต่อไปได้ จึงเกิดการหยุดการเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอ ทำให้ได้ PCR product ที่แตกต่างกัน 1 bp ซึ่งแต่ละ ddNTP จะติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน ทำให้ได้สัญญาณของแต่ละลำดับเบสที่แตกต่างกัน สามารถแปลผลเป็นลำดับเบสได้

Sanger sequencing มีข้อจำกัดคือ อาจให้ผลคลาดเคลื่อนได้ในช่วง 10-45 bp แรกของสารพันธุกรรม เนื่องจากเป็นจุดเริ่มต้นของ primer และสามารถวิเคราะห์สารพันธุกรรมที่มีความยาวไม่เกิน 1000 pb หากสารพันธุกรรมที่ต้องการวิเคราะห์มีความยาวมากกว่า 1000 bp จำเป็นต้องออกแบบ primers ที่จำเพาะเป็นช่วงๆ โดยทั่วไปการหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมจะทำจาก primer เพียง 1 เส้น (forward หรือ reverse primer) แต่หากสามารถวิเคราะห์ได้ 2 primers ร่วมกัน จะทำให้ผลที่ได้มีความถูกต้องมากขึ้น Sanger sequencing ไม่เหมาะกับการศึกษา large deletion mutation เนื่องจากสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้จะเป็น peak ซ้อนกันตั้งแต่บริเวณที่มีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์(28)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 การศึกษา hybrid glycoprotein

จากการที่ขาดแอนติชีรั่มที่จำเพาะเพื่อใช้ในการศึกษา hybrid glycoprotein และในบาง hybrid glycoprotein นั้น มีลักษณะที่แสดงออกทางฟีโนไทป์ไม่แตกต่างกัน ทำให้การศึกษา hybrid glycoprotein ด้วยเทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยาเป็นไปได้ยาก การศึกษา hybrid glycoprotein ทางอณูชีววิทยาจึงเป็นที่นิยมมากขึ้น โดยการศึกษา hybrid glycoprotein นั้น เป็นที่นิยมในประเทศในประชากรชาวเอเชียมากกว่า เนื่องจากมีความถี่ของ hybrid glycoprotein สูงกว่าเชื้อชาติอื่นๆ โดยการศึกษาส่วนมากพบในประชากรชาวจีน เนื่องจากมีความพร้อมทางเทคโนโลยีและจำนวนตัวอย่างเทคนิคต่างๆ ที่มีการนำมาใช้ในการศึกษา hybrid glycoproteins สรุปได้ดังตารางที่ 6



ตารางที่ 6 สรุปงานวิจัยและเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ศึกษา hybrid glycophorin

ผู้ศึกษา	เทคนิคที่ใช้	ข้อดี	ข้อจำกัด	สรุปผลการทดลอง
P Jongruamklang และคณะ(20) ประเทศไทย (ทำการศึกษาที่ประเทศสวีเดน)	sequencing	สามารถแยกชนิดของ hybrid glycophorin ได้ชัดเจน และสามารถบอกความเป็น homozygous ได้	อาศัยความชำนาญ ใช้เครื่องมือจำเพาะ ราคาสูง	1. ประชากรไทยที่มีแอนติเจน Mi(a+) จำนวน 63 ราย ร้อยละ 88.9 เป็น GP.Mur 2. ประชากรไทยที่มีแอนติเจน Mi(a+) ร้อยละ 8 ไม่มีการแสดงออกของ GPB ซึ่งเกิดจาก GYP^*Mur/GYP^*Mur และ $GYP^*Mur/GYP^*Bun-like$
Genghis H. Lopez และคณะ ประเทศออสเตรเลีย (19, 29)	PCP HRM	สามารถแยกชนิดของ hybrid glycophorin ได้ชัดเจน และสามารถบอกความเป็น homozygous ได้	การออกแบบ primers ต้องมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง common ของ $GYP^*(B-A-B)$ เพื่อให้ตรวจจับ $GYP^*(B-A-B)$ ได้ทุกชนิด และสามารถศึกษา hybrid glycophorin ชนิดอื่นๆได้พร้อมกัน	1. ค้นพบแอนติเจนใหม่เรียกว่า JENU และบรรจุเป็นแอนติเจนลำดับที่ 49 ในระบบ MNS 2. ความถี่ของแอนติเจน Mi^a ในประชากรชาวออสเตรเลียคือร้อยละ 0.22 และพบ GP.Mur สูงสุด

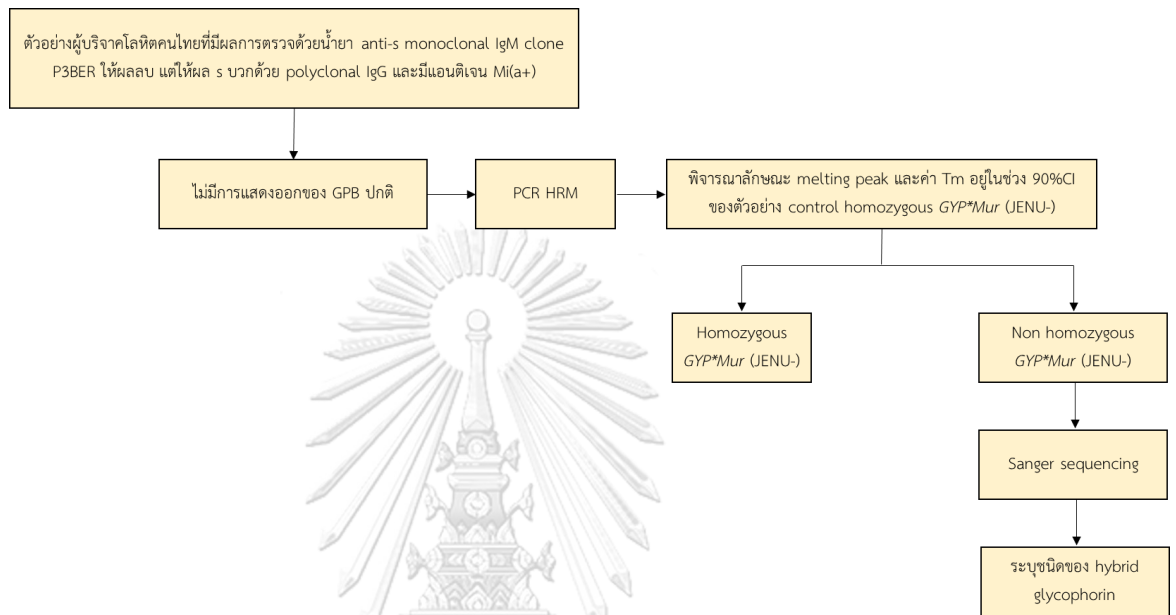
ตารางที่ 6 สรุปงานวิจัยและเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ศึกษา hybrid glyco-phorin (ต่อ)

ผู้ศึกษา	เทคนิคที่ใช้	ข้อดี	ข้อจำกัด	สรุปผลการทดลอง
Shih MC และคณะ (30) ประเทศจีน	PCR-RFLP	สามารถตรวจ hybrid glyco-phorin แต่ละชนิดได้	เนื่องจาก PCR-RFLP เป็นการใช้น้ำหนักของ PCR product หลังการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงจำเป็นต้องมีการ sequencing เพื่อยืนยันกรณีพบขนาด PCR product เท่ากัน	ประชากรจีนชาวฮั่นที่อาศัยอยู่ในไต้หวัน มี hybrid glyco-phorin ชนิด GYP*(B-A-B) ร้อยละ 4.92 และในประชากรชาวจีนทางใต้พบได้ร้อยละ 4.3-7.3
P Palacajornsuk และคณะ(23) และ C Kaset และคณะ (26) ประเทศไทย	PCR-SSP	สามารถตรวจ hybrid glyco-phorin แต่ละชนิดได้	จำเป็นต้องใช้เทคนิค sequencing เพื่อยืนยันผล เช่นเดียวกับ PCR-RFLP กรณีขนาดของ PCR product เท่ากัน	1. PCR-SSP พบว่ามีความไวและความจำเพาะ 100% 2. ประชากรชาวไทย ภาคกลาง พบ hybrid glyco-phorin ร้อยละ 7.4 ในขณะที่ภาคเหนือพบ hybrid glyco-phorin ได้ร้อยละ 23
Ling Wei และคณะ (9) ประเทศจีน	HRM เปรียบเทียบ กับ MLPA	สามารถแยกชนิดของ hybrid glyco-phorin ได้ชัดเจน และสามารถบอกความเป็น homozygous ได้	MLPA ต้องใช้เครื่องมือจำเพาะ ราคาสูง และไม่สามารถแยกชนิดของ hybrid glyco-phorin บางชนิดได้	HRM เป็นเทคนิคที่ไว มีความจำเพาะและต้นทุนไม่สูง มีความเหมาะสมต่อการศึกษา hybrid glyco-phorin

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยในภาพรวม แสดงดังรูปภาพที่ 12 โดยมีรายละเอียดในแต่ละขั้นตอนดังนี้



รูปภาพที่ 12 สรุปขั้นตอนการวิจัย ซึ่งประกอบด้วย การคัดเลือกตัวอย่างเพื่อทดสอบ PCR HRM และการแปลผลการทดสอบ โดยกรณีที่ไม่ได้ผลไม่ใช่แอนติเจน JENU negative จะทำการตรวจด้วย Sanger sequencing เพื่อระบุชนิดของ GYP gene ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เกณฑ์ในการการคัดเลือกตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตเพื่อเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้วิจัยมีหลักการคัดเลือกดังนี้

- ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตชนิด EDTA ซึ่งเป็นผู้บริจาคโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติหรือหน่วยรับบริจาคโลหิตเคลื่อนที่ ที่รับบริจาคโลหิตในเขตกรุงเทพมหานคร
- ให้ผลตรวจ infectious marker เป็นลบ หรือให้ผล non-reactive
- มีการบริจาคโลหิตอย่างน้อย 2 ครั้งขึ้นไป

- ไม่จำกัดเพศ และอายุของผู้บริจาค
- เป็นตัวอย่างคัดทิ้งหลังจากศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติตรวจแอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดงเสร็จสิ้น
- มีผลการตรวจแอนติเจน s negative ด้วย anti-s monoclonal IgM clone P3BER แต่ให้ผลการตรวจแอนติเจน s positive ด้วย anti-s polyclonal IgG และมีผลการตรวจแอนติเจน Mi(a+)

จำนวนตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างที่ขอใช้ในโครงการ ที่ได้จากการคำนวณทางสถิติ จากสูตร sample size proportion ดังต่อไปนี้

$$n = \frac{1.96^2 p(1-p)}{E^2}$$

โดยกำหนด Z คือ ค่าความเชื่อมั่น = 0.05, P คือสัดส่วนที่เกิดความชุก = 0.08 อ้างอิงจากความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ(20), E คือค่าการตัดสินใจ = 0.05 ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการศึกษานี้ คือ จำนวน 60 ราย ขั้นตอนการศึกษานี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมสภาการศึกษาไทย รหัสโครงการ 11/2564

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2 การสกัด DNA โดยใช้เครื่องสกัด DNA อัตโนมัติ Symphony (Qiagen, German)

หลักการการสกัด DNA โดยเครื่องอัตโนมัติ Symphony (Qiagen, German) ใช้หลักการของ Magnetic beads โดยขั้นตอนแรกคือ เครื่องจะทำให้เม็ดเลือดขาวในตัวอย่างแตก โดยใช้น้ำยา Lysis Buffer เมื่อเซลล์ปล่อยสารพันธุกรรมสาย DNA ออกสู่ภายนอกเซลล์ สารพันธุกรรมชนิด DNA นั้นจะจับกับ magnetic beads และจะทำการล้างสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น โปรตีน เกลือต่างๆ เป็นต้น ที่ปนเปื้อนกับ DNA ออก ก่อนที่ DNA ที่จับกับ magnetic beads จะถูกชะออก เพื่อให้ได้ DNA ที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์อื่นๆต่ำ ตัวอย่าง DNA จะถูกนำไปใส่หลอดตัวอย่างและนำไปวัดความ

เข้มข้นและการปนเปื้อนของโปรตีนในตัวอย่าง DNA (A260/A280) โดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer (ThermoFisher, USA) โดยผลการปนเปื้อน หรือ คุณภาพ DNA (A260/A280) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ คือ 1.65-2.0 ตัวอย่าง DNA จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะเริ่มทำการทดสอบ โดยก่อนการทดสอบ ผู้วิจัยจะต้องเตรียม DNA ให้มีความเข้มข้น 10 ng/ μ L ใน RNase free water ก่อนการทดสอบ และวัดค่าความเข้มข้นของสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง nanodrop อีกครั้ง

3.3 การตรวจหาแอนติเจนที่แสดงบนเม็ดเลือดแดงโดยวิธีน้ำเหลืองวิทยาหรือการใช้แอนติบอดี

ตัวอย่างเลือดเต็มส่วนของผู้บริจาคโลหิต ชนิด EDTA จะทำการทดสอบหาแอนติเจน S, s และ Mi^a โดยใช้น้ำยา anti-S monoclonal IgM clone MS-94 (MilliporeSigma Ltd., USA), anti-s monoclonal clone P3BER (MilliporeSigma Ltd., USA) และ anti-Mi^a human monoclonal (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ประเทศไทย) ตามลำดับ ใช้หลักการ heme agglutination microplate ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ PK7300 (Beckman Coulter, USA) ในกรณีที่ผลการตรวจแอนติเจน s ให้ผลเป็นลบร่วมกับผลการตรวจแอนติเจน Mi^a ให้ผลบวก จะทำการทดสอบยืนยันด้วยน้ำยา anti-s polyclonal IgG (Ortho Clinical Diagnostic Ltd., USA) โดยใช้หลักการ column agglutination test ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho Vision Max

3.4 การออกแบบ primers

Forward primer 5'-ACGGCAGTCACCTCATTCTTGTT-3' (Tm=57°C) และ Reverse primer 5'-GGCTTTGGAGTAAA GAGTTGGG-3' (Tm=57°C) ที่ใช้ อ้างอิงมาจากผลงานตีพิมพ์ ก่อนหน้านี้ที่ใช้หลักการทดสอบ PCR HRM(9, 19, 29) ซึ่งมีความจำเพาะกับ exon 3 ของยีน *GYP*B* เมื่อนำมา local alignment โดยใช้ NCBI Blast เพื่อตรวจสอบความจำเพาะและ Tm โดยขนาด PCR product ที่คาดว่าจะได้ สำหรับ *GYP*B*, *GYP*^{Mur}* และ *GYP*^{Bun}* คือ 270 bp ดังแสดงใน **รูปภาพที่13**

Forward	Reverse	GYP A	GYP B	GYP*Mur	GYP*Bun
Primer 7	Primer 9	No product	270 bp [✓]	270 bp [✓]	270 bp ^{✓*}

```

GYP A  acgcagtcacctcattcttgtgccctttctcaacttctcttatatgcagatacgcacaaacgggacacatatgcagccactcctagagctcatgaa
GYP B  acgcagtcacctcattcttgtccctttctcaacttctcttatatgcagataagcacaacgggacacatatccagc---tcatactgctaatagaa
GYP*Mur acgcagtcacctcattcttgtccctttctcaacttctcttatatgcagataagcacaacgggacacatatccagc---tcatactgctaatagaa
GYP*Bun acgcagtcacctcattcttgtccctttctcaacttctcttatatgcagataagcacaacgggacacatatccagc---tcatactgctaatagaa
Primer 7
gtttcagaaatttctgttagaactgtttaccctccagaagagggaaaccggtatgttcttagttttaaatagttgctctggagtcattgtgtgatt
gtttcagaaatttctgttagaactgtttaccctccagaagagggaaaccggtatgttcttagttttaaatagtttctctggagtcattgtgtgatt
gtttcagaaatttctgttagaactgtttaccctccagaagagggaaaccggtatgttcttagttttaaatagttgctctggagtcattgtgtgatt
gtttcagaaatttctgttagaactgtttaccctccagaagagggaaaccggtatgttcttagttttaaatagttgctctggagtcattgtgtgatt

gaactctatttacacgagctgtaactcatgacagttctcaagctttcgtgacagaaaacccatctcttttactccaaagcc GYP A
gaactctatttacacgagctgtaactcatgacagttctcaaaactttcgtgacagaaaaccaactcttttactccaaagcc GYP B
gaactctatttacacgagctgtaactcatgacagttctcaaaactttcgtgacagaaaaccaactcttttactccaaagcc GYP*Mur
gaactctatttacacgagctgtaactcatgacagttctcaagctttcgtgacagaaaacccatctcttttactccaaagcc GYP*Bun
Primer 9

```

รูปภาพที่ 13 แสดงลำดับเบสของ GYP*A, GYP*B, GYP*Mur และ GYP*Bun และตำแหน่งที่ primers จำเพาะ (สีฟ้าคือตำแหน่งของ forward primer และสีเหลืองคือตำแหน่งของ reverse primer) ขนาดของ PCR product ที่คาดว่าจะได้คือ 270 bp

3.5 การตรวจ Genotyping โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction - High Resolution Melting Assay (PCR HRM)

1) ชุดน้ำยาที่ใช้ คือ Type-it HRM PCR Kit (Qiagen Ltd, Netherlands) เตรียม master mix โดยนำสารละลาย 2x Master Mix, primer solutions, RNase free water, template DNAs และ control DNAs ละลายที่อุณหภูมิห้อง และเตรียมสาร ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำยาในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

สารละลาย	ปริมาตร (μL)	ความเข้มข้น
2x Master mix	12.5	2x
0.9 μM primer mix	1.3	10 $\mu\text{mol/L}$
RNase-free water	7.9	-
Template DNA	2	20 $\text{ng}/\mu\text{L}$
รวม	25	-

2) ทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยเครื่อง thermocycler LightCycle 480 (Roche Diagnostics Ltd., switzerland) โดยตั้งค่า cycle อ้างอิงจากการศึกษา hybrid glycoporphin โดยใช้เทคนิค HRM (9, 19, 29) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดง PCR cycle protocol

ขั้นตอน	เวลา	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	จำนวน cycle
Initial activation	5 mins	95	45 cycles
Denaturation	10 sec	95	
Annealing	30 sec	55	
Extension	10 sec	72	

3) ทำการวิเคราะห์ HRM โดยตั้งค่าให้อุณหภูมิที่วิเคราะห์ตั้งแต่ $70-90^{\circ}\text{C}$ (T_m เป้าหมายอยู่ในช่วง 79-80) โดยเปลี่ยนแปลง 0.02°C ทุก 1 วินาที (acquisition 25, Lamp rate 0.02°C/s) วัดการเปลี่ยนแปลงของสี EvaGreen ซึ่งจับกับ double strand DNA เท่านั้น

3.6 การแปลผลการทดสอบและสถิติที่ใช้

เนื่องจาก hybrid glycoporphins แต่ละชนิดมีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อย ทำให้ค่า T_m ของ PCR product ที่ได้มีความใกล้เคียงกันมาก ผู้วิจัยจำเป็นต้องแปลผลการทดสอบ โดยอาศัยพิจารณาลักษณะของ melting peak ร่วมกับค่า T_m เฉลี่ยที่ได้จากการทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เทียบกับตัวอย่างที่ทราบจีโนไทป์แล้ว

3.6.1 แปลผลโดยใช้ค่า Melting Temperature (T_m)

ตัวอย่างที่ทดสอบให้ค่า T_m เฉลี่ยในการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ซึ่งวิเคราะห์จากโปรแกรมวิเคราะห์ melting analysis ต่างกันไม่เกินช่วง 90% Confidence interval (CI) ของตัวอย่างควบคุมที่เป็น homozygous *GYP* μ Mur* (JENU-) (อ้างอิงค่าค่าสถิติการเปรียบเทียบจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้เทคนิค PCR HRM(9, 19, 29)) จึงจะแปลผลว่าเป็น glycophorin ชนิด homozygous *GYP* μ Mur* (JENU-) ชนิดเดียวกัน กรณีค่า T_m ไม่อยู่ในช่วง 90%CI ของตัวอย่างควบคุมที่เป็น homozygous *GYP* μ Mur* (JENU-) จะแปลผลว่าเป็น non homozygous *GYP* μ Mur* และส่งตรวจ Sanger sequencing ต่อไปเพื่อระบุชนิดของ hybrid glycoporphins การคำนวณค่า 90%CI ใช้โปรแกรม Microsoft excel เครื่องมือใน Data Analysis ซึ่งเป็นเครื่องมือใน Analysis Toolpack

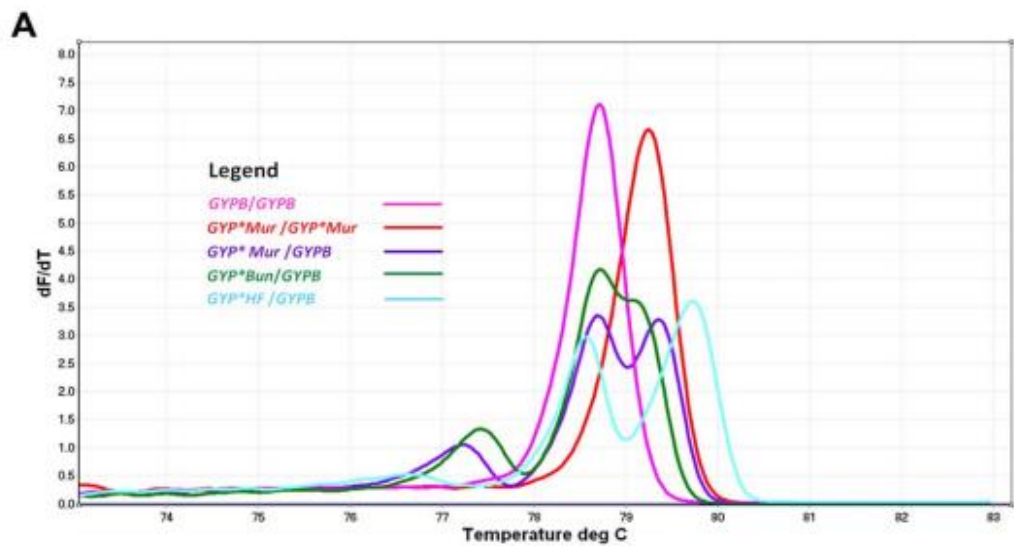
ทั้งนี้ เมื่ออ้างอิงค่า T_m ของการศึกษาที่ใช้หลักการ PCR HRM ก่อนหน้านี้(9, 19, 29) จะได้ค่า T_m ที่คาดการณ์ อยู่ในช่วง 79-80°C และแต่ละ glycoporphins ต่างกันไม่เกิน 1°C ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลของ T_m ที่คาดว่าจะได้ จาก hybrid glycophorinแต่ละชนิด

Gene	T_m (°C)
<i>GYP*B/GYP*B</i> (Homozygous <i>GYP*B</i>)	78.95
<i>GYP*B/GYP*μMur</i> (Heterozygous <i>GYP*μMur</i>)	ได้ค่า T_m เป็น 2 peaks ได้แก่ 78.95,79.55
<i>GYP*μMur/GYP*μMur</i> (Homozygous <i>GYP*μMur</i>)	79.55

3.6.2 แผลผลจากลักษณะของ melting peak

ตัวอย่างที่มีลักษณะของ melting peak ใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม homozygous *GYP*^{Mur}* (JENU-) จึงจะแปลผลว่าเป็น glycoprotein ชนิด homozygous *GYP*^{Mur}* (JENU-) ชนิดเดียวกัน ลักษณะของ melting peak ที่คาดการณ์แสดงในรูปภาพที่ 14 โดยอ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ใช้ primers ชนิดเดียวกัน (19, 29)



รูปภาพที่ 14 แสดงลักษณะของ melting peak ที่คาดการณ์ เกิดจากการที่มี glycoprotein ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ค่า T_m ของแต่ละชนิดแตกต่างกัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

แบ่งผลการทดลองเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

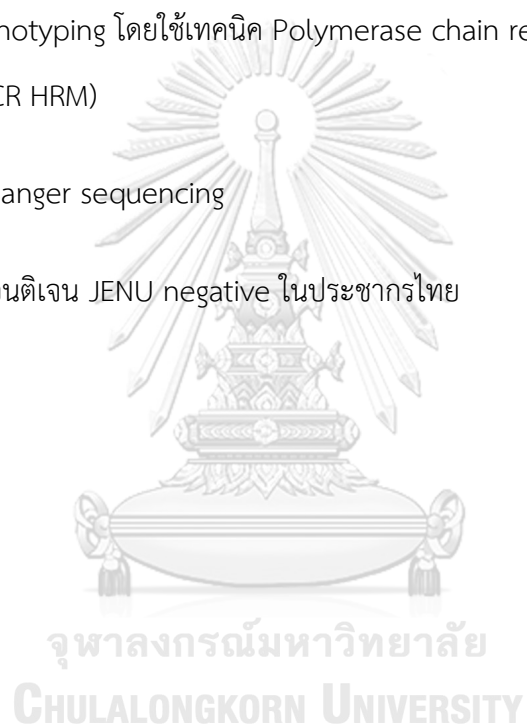
4.1 การเตรียมตัวอย่าง

4.2 การตรวจสอบความถูกต้องของ PCR และ HRM protocol

4.3 การตรวจ Genotyping โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction - High resolution melting (PCR HRM)

4.4 การทดสอบ Sanger sequencing

4.5 ความถี่ของแอนติเจน JENU negative ในประชากรไทย



4.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างผู้บริจาคที่ตรงตามเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าโครงการ หลังจากสกัด DNA แล้วนำมาทำการเตรียมให้ DNA มีความเข้มข้นประมาณ 10 ng/ μ L วัดความเข้มข้นของ DNA โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Nanodrop) พบว่า DNA ที่เตรียมได้ มีค่าความเข้มข้นเฉลี่ย 10.82 \pm 3.5 ng/ μ L ผลการวัดความเข้มข้นของตัวอย่าง DNA และค่า A260/A280 แสดงในภาคผนวก ข

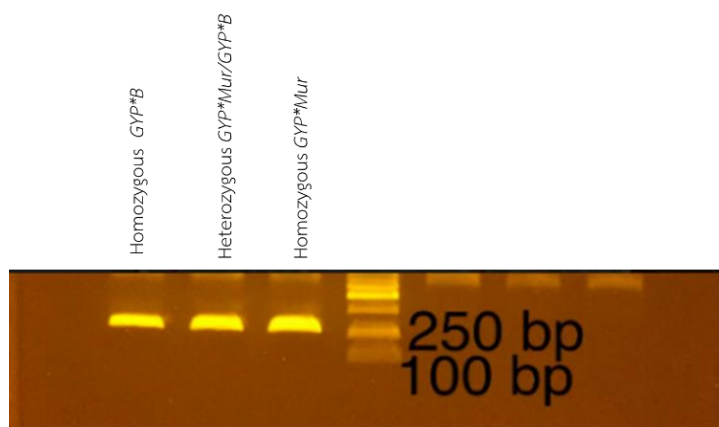
4.2 การตรวจสอบความถูกต้องของ PCR และ HRM protocol

4.2.1 การตรวจสอบชนิดของ glycoporphins ที่นำมาเป็นตัวอย่างควบคุม

ตัวอย่างที่คาดว่าจะนำมาเป็นตัวอย่างควบคุม ได้แก่ homozygous *GYP*B*, heterozygous *GYP*Mur/GYP*B* และ homozygous *GYP*Mur* จะถูกนำมายืนยันโดยใช้เทคนิค Sanger sequencing และนำผลที่ได้มาทำ global alignment เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากผลการศึกษาลำดับเบสของตัวอย่างดังกล่าว พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้ง 3 ให้ผลตรงตามที่คาด ได้แก่ homozygous *GYP*B*, heterozygous *GYP*Mur/GYP*B* และ homozygous *GYP*Mur* ผลการทำ alignment ดังภาคผนวก ค

4.2.2 ขนาดของ PCR products

PCR products ที่ได้จะถูกนำไป run gel electrophoresis (2% agarose gel กระแสไฟฟ้า 150 Volt เป็นเวลา 10 นาที) โดย PCR products ที่คาดว่าจะได้ จะมีขนาด 270 bp ทั้งหมด จากผลการทดสอบ พบว่า ขนาด PCR products ที่ได้ของ homozygous *GYP*B*, heterozygous *GYP*Mur/GYP*B* และ homozygous *GYP*Mur* ได้ขนาด 270 bp ตรงตามที่คาดการณ์ ผลการ run gel electrophoresis ดังรูปภาพที่ 15



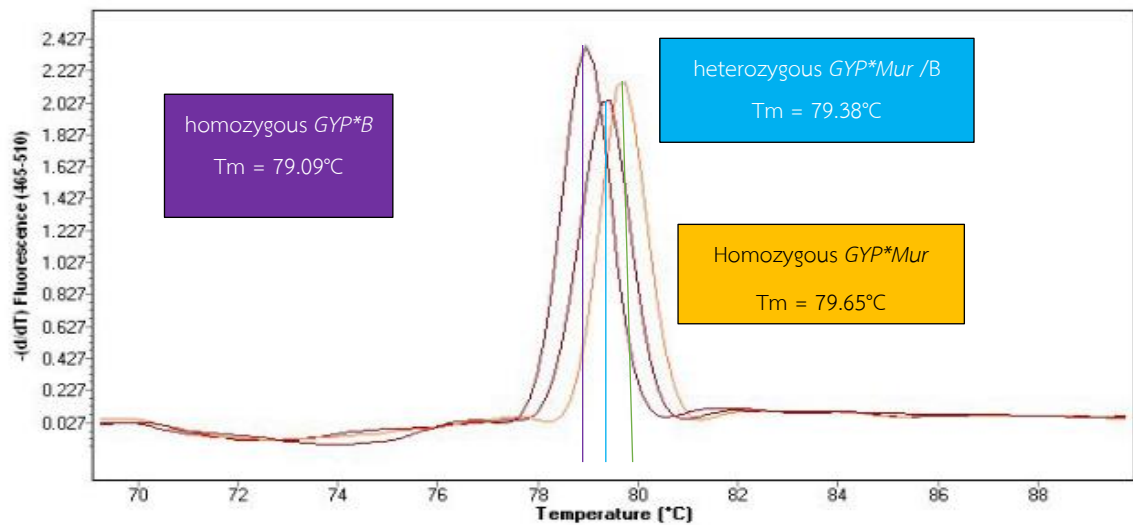
รูปภาพที่ 15 แสดงขนาด PCR product ที่ได้จากการ run gel electrophoresis

4.2.3 ค่า Melting temperature และลักษณะของ Melting peak ที่ได้

ค่า Tm เฉลี่ยจากการทำการทดสอบ 3 ครั้ง (Triplicate) ของตัวอย่างควบคุม

- homozygous GYP*B ได้ค่า Tm เฉลี่ย = $79.09 \pm 0.01^{\circ}\text{C}$
- heterozygous GYP*Mur/GYP*B ได้ค่า Tm เฉลี่ย = $79.38 \pm 0.03^{\circ}\text{C}$
- Homozygous GYP*Mur ได้ค่า Tm เฉลี่ย = $79.65 \pm 0.01^{\circ}\text{C}$

ลักษณะของ Melting peak ของตัวอย่างควบคุม แสดงในรูปภาพที่ 16

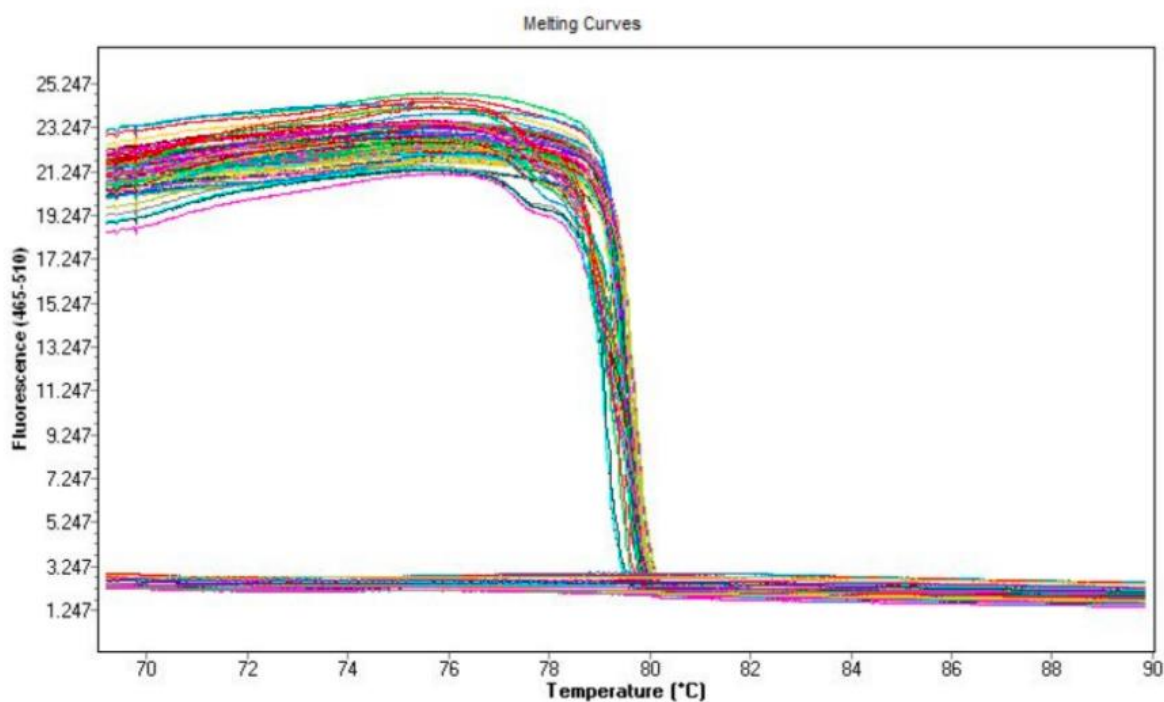


รูปภาพที่ 16 ลักษณะ melting peak ของตัวอย่างที่ทราบชนิด glycophorins สามารถแยกลักษณะและค่า T_m ที่แตกต่างกันได้

4.3 การตรวจ Genotyping โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction - High resolution melting (PCR HRM) ในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตชาวไทยจำนวน 60 ราย

4.3.1 การแปลผลจากค่า T_m

จากผลการทำ GYP gene genotyping ในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตจำนวน 60 ราย ผู้วิจัยพบว่าค่า T_m ที่ได้ของ PCR products ทั้งหมดที่เกิดขึ้น อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 78-90°C ซึ่งตรงกับช่วงค่า T_m ที่คาดการณ์ว่าจะได้ของตัวอย่างที่เป็น hybrid glycophorin แสดงให้เห็นว่า PCR products ที่เกิดขึ้น มีความจำเพาะต่อยีน GYP*(B-A-B) และไม่มีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมชนิดอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องข้องกับ GYP gene ดังรูปภาพที่ 17



รูปภาพที่ 17 แสดง melting curve ของตัวอย่าง ซึ่งให้ค่า T_m อยู่ในช่วงการวิเคราะห์ 70-90°C

จากผลการทดสอบ PCR HRM โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) ในตัวอย่างควบคุมที่ทราบชนิดของ glycophorins ได้แก่ heterozygous GYP^*Mur/GYP^*B , Homozygous GYP^*Mur และ homozygous GYP^*B พบว่า HRM protocol ที่ใช้ สามารถแยกชนิด glycophorin ของตัวอย่างควบคุมได้ชัดเจน โดยให้ผลการทดสอบ ดังนี้

- homozygous GYP^*B ได้ค่า T_m เฉลี่ย = $79.09 \pm 0.01^\circ\text{C}$
- heterozygous GYP^*Mur/GYP^*B ได้ค่า T_m เฉลี่ย = $79.38 \pm 0.03^\circ\text{C}$
- Homozygous GYP^*Mur ได้ค่า T_m เฉลี่ย = $79.65 \pm 0.01^\circ\text{C}$

ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาความแตกต่างของค่า T_m ของแต่ละตัวอย่างผู้วิจัยทำการสรุปลงใน ตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ความแตกต่างค่า T_m ของตัวอย่างที่ทราบชนิด glycoporphin

glycophorin	ความแตกต่างของอุณหภูมิเมื่อเทียบกับ Genotype ชนิดต่างๆ		
	homozygous GYP^*B	heterozygous GYP^*Mur/GYP^*B	homozygous GYP^*Mur
homozygous GYP^*B	0°C	0.29°C	0.56°C
heterozygous GYP^*Mur/GYP^*B	0.29°C	0°C	0.27°C
homozygous GYP^*Mur	0.56°C	0.27°C	0°C

จากผลการทดลอง ในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตจำนวน 60 ราย พบว่าได้ผล T_m ดังแสดงในภาคผนวก ง ยกตัวอย่างการแปลผลชนิดของ hybrid glycoporphins โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย T_m ที่ได้จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งกับค่า 90%CI ของค่า T_m ของตัวอย่างควบคุม homozygous GYP^*Mur (JENU-) ซึ่งคำนวณได้ในการทดสอบแต่ละครั้ง ได้ดังตารางที่ 11 และตารางที่ 12

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มีผู้บริจาคโลหิตจำนวน 49 ราย (ร้อยละ 81.6) ที่ยืนยันว่าเป็น homozygous GYP^*Mur และตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตจำนวน 11 ราย (ร้อยละ 18.3) เป็น non-homozygous GYP^*Mur ซึ่งต้องทำการยืนยันชนิดของ hybrid glycoporphin ด้วยวิธี Sanger sequencing ต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 13

ตาราง 11 ตัวอย่างการแปลผลการทดสอบโดยใช้ค่า T_m เฉลี่ย เปรียบเทียบค่า 90%CI ของตัวอย่างควบคุม homozygous GYP**Mur* (JENU-) แปลผลเป็น **Homozygous GYP**Mur* (JENU-)**

Sample No.	T_m เฉลี่ย	90%CI ของตัวอย่างควบคุม JENU-	แปลผล
10063W04361	79.78	79.717 – 80.033	homozygous GYP*(<i>Mur</i>)
10063A85179	79.81	79.717 – 80.033	homozygous GYP*(<i>Mur</i>)
10063P04679	79.89	79.717 – 80.033	homozygous GYP*(<i>Mur</i>)

ตารางที่ 12 ตัวอย่างการแปลผลการทดสอบโดยใช้ค่า T_m เฉลี่ย เปรียบเทียบค่า 90%CI ของ control homozygous GYP**Mur* (JENU-) แปลผลเป็น **non homozygous GYP**Mur***

Sample No.	T_m เฉลี่ย	90%CI ของตัวอย่างควบคุม JENU-	แปลผล
10063V38327	79.17	79.337 – 79.653	non homozygous GYP*(<i>Mur</i>)
10063V24845	79.32	79.337 – 79.653	non homozygous GYP*(<i>Mur</i>)

ตารางที่ 13 สรุปการแปลผลการตรวจรูปแบบของ hybrid glycoophorin (B-A-B) ในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตชาวไทย ที่มีผลการตรวจ s- แอนติเจนด้วย anti-s monoclonal IgM clone P3BER ให้ผลลบ แต่การตรวจ anti-s polyclonal IgG ให้ผลบวก

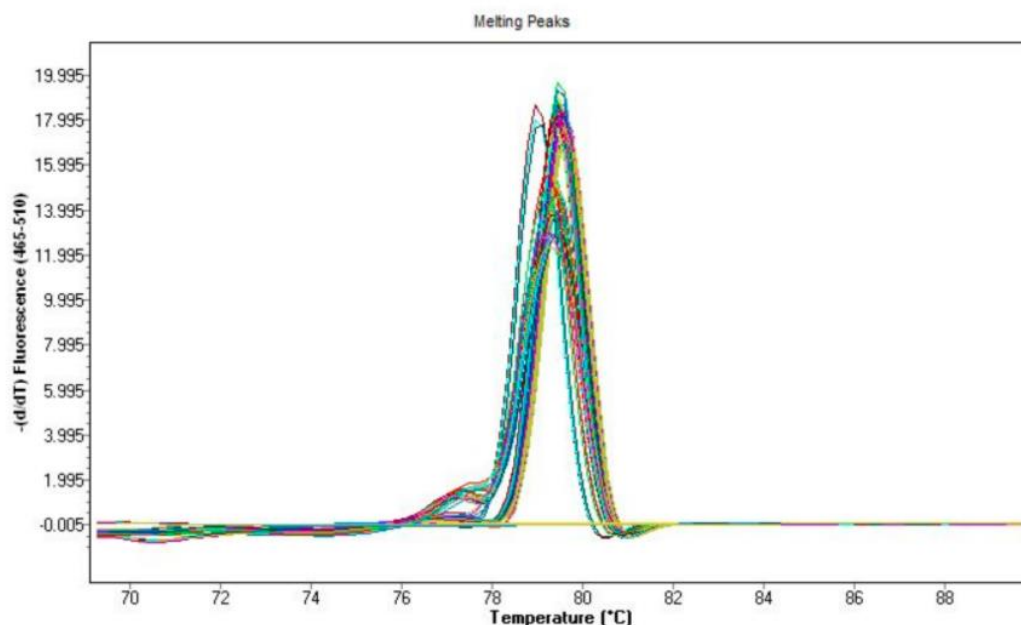
ผลการตรวจ red cell phenotype	จำนวนผู้บริจาคที่แปลผลเป็น Homozygous <i>GYP*Mur</i> (JENU-)	จำนวนผู้บริจาคที่แปลผลเป็น Non homozygous <i>GYP*Mur</i>	รวม
s-(monoclonal IgM clone P3BER) s+(polyclonal IgG) Mi(a+)	49 (Tm เฉลี่ย 79.63 ± 0.03 , 90%CI = 79.337-81.302)	11 (Tm เฉลี่ย 79.59 ± 0.04)	60

4.3.2 การแปลผลลักษณะของ melting peak

เมื่อพิจารณาลักษณะของ melting peak จะพบว่าให้ลักษณะของ peaks แบ่งได้เป็น 3 ลักษณะหลักๆ ได้แก่

1. homozygous *GYP*Mur* (JENU-) ซึ่งจะให้ลักษณะ melting peak และค่า Tm คล้ายกับตัวอย่าง ควบคุม homozygous *GYP*Mur* (JENU-)
2. homozygous hybrid glycoophorin ชนิดอื่นๆ ซึ่งจะให้ลักษณะ melting peak สูงเช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุมที่เป็น homozygous *GYP*Mur* (JENU-) แต่ตำแหน่ง Tm จะแยกออกจากตัวอย่าง ควบคุม homozygous *GYP*Mur* (JENU-) อย่างชัดเจน
3. heterozygous hybrid glycoophorin ชนิดอื่นๆ จะให้ลักษณะของ melting peak ต่ำกว่ากลุ่มที่เป็นตัวอย่าง homozygous และตำแหน่งของ Tm จะอยู่กึ่งกลางระหว่างตัวอย่างควบคุมที่เป็น homozygous *GYP*Mur* (JENU-) และตัวอย่างทดสอบที่เป็น homozygous hybrid glycoophorin ชนิดอื่นๆ โดยมีลักษณะพิเศษคือจะพบ peak เล็กๆก่อนที่จะเป็น peak ที่สามารถวัดค่า Tm ได้ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่กลุ่มตัวอย่างที่เป็น heterozygous นี้ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ ทำให้

ลักษณะของ melting peak ที่ได้แตกต่างกับตัวอย่าง heterozygous *GYP*^{Mur}/GYP*^B* ดังรูปภาพ
ที่ 18



รูปภาพที่ 18 แสดง melting peak ของตัวอย่าง สามารถแบ่งลักษณะของ peaks ได้เป็น 3
ลักษณะหลัก

4.4 การหาลำดับเบสโดยใช้เทคนิค Sanger sequencing

จากตัวอย่างจำนวน 11 รายที่แปลผลเป็น non homozygous *GYP*^{Mur}* ผู้วิจัยได้ทำการ
ส่งตรวจ genotyping ด้วยวิธี Sanger sequencing เมื่อได้ผลการทดสอบแล้ว ผู้วิจัยทดสอบทำ
global alignment ใช้โปรแกรม Geneious Prime วิธี ClustalW Multiple alignment กำหนดค่า
parameter ต่างๆ ดังนี้

1. Global alignment with free end gaps
2. Cost matrix 70% similar (IUB) (5.0/-4.5)

โดยผู้วิจัยใช้ลำดับเบสอ้างอิง (reference sequence) จากฐานข้อมูล NCBI ดังนี้

1. *GYP*B* (NG_007483.2)
2. *GYP*HF* (M81079)
3. *GYP*Mur* (JN201202.2)
4. *GYP*Bun* (M60710)
5. *GYP*Hop* (KR815995)
6. *GYP*Kip* (KF501485)
7. *GYP*Bun* Chinese variant (KR363627.1)

วิธีการอ่านผลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ จะใช้ผลที่ได้จาก forward primer และ reverse primer เปรียบเทียบกัน สรุปผลการทำ alignment แปลผลชนิดของ glycoporins ได้ดังตารางที่ 14 และสรุปจำนวนของ glycoporins ชนิดต่างๆ พร้อมทั้งค่า Tm ของตัวอย่างได้ดังตารางที่ 15 รายละเอียดผลการทำ nucleotide alignment ดังภาคผนวก จ

ตารางที่ 14 แสดงผล alignment และการแปลผลชนิด glycoporphins ในตัวอย่างที่เปรียบเทียบค่า Tm แปลผลได้เป็น non homozygous GYP**Mur*

Sample No	Tm เฉลี่ย	ชนิดของ hybrid glycoporphin	rs number reference sequence
10063Q34845	79.76	<i>GYP*<i>Mur</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	JN201202.2/M60710.1
10063M85003	79.42	<i>GYP*<i>Mur</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	JN201202.2/M60710.1
10063U06884	79.44	<i>GYP*<i>Mur</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	JN201202.2/M60710.1
10063V24845	79.32	<i>GYP*<i>Mur</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	JN201202.2/ KR363627.1*
10063Q73555	79.36	<i>GYP*<i>Bun</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	KR363627.1*/KR363627.1*
10063G07208	79.57	<i>GYP*<i>Bun</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	KR363627.1*/M60710.1
10063407655	79.34	<i>GYP*<i>BS</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	NG_007483.2/ KR363627.1*
10063V23354	79.28	<i>GYP*<i>BS</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	NG_007483.2/ KR363627.1*
10063V23910	79.31	<i>GYP*<i>BS</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	NG_007483.2/ KR363627.1*
10063V24049	79.25	<i>GYP*<i>BS</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	NG_007483.2/ KR363627.1*
10063V38327	79.17	<i>GYP*<i>BS</i>/ GYP*<i>Bun</i></i>	NG_007483.2/ KR363627.1*

* Chinese variant

ตารางที่ 15 สรุปจำนวนของ glycophorins แต่ละชนิดในตัวอย่างที่แปลผลเป็น non homozygous GYP*Mur

ผลการตรวจ red cell phenotype (Reagent clone)				heterozygous GYP*Mur/ GYP*Bun	homozygous GYP*Bun	heterozygous GYP*BS/ GYP*Bun	รวม
S (MS 64)	s (P3BER)	s (polyclonal)	Mi ^a (human monoclonal)				
0	0	+	+	4 (Tm เฉลี่ย 79.49±0.04)	2 (Tm เฉลี่ย 79.47±0.02)	0	6
+	0	+	+	0	0	5 (Tm เฉลี่ย 79.27±0.004)	5

4.5 ความถี่ของแอนติเจน JENU negative ในประชากรไทย

คำนวณโดยอ้างอิงจากการศึกษาความถี่ของแอนติเจน Mi(a+) ในประชากรคนไทย โดยใช้เทคนิค PCR-SSP ซึ่งได้ความถี่ของแอนติเจน Mi(a+) ในประชากรคนไทย ร้อยละ 10(23) และการศึกษาตัวอย่างที่มีแอนติเจน Mi(a+) ในประชากรคนไทยโดยใช้เทคนิค sequencing พบว่าโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ ในประชากรคนไทยที่มีแอนติเจน Mi(a+) เป็นร้อยละ 8(20) จากผลการทดสอบพบว่าความถี่ของแอนติเจน JENU negative ในประชากรคนไทย และ hybrid glycophorins อื่นๆ ที่ทำให้เกิดผลลบลวมในการตรวจแอนติเจน s ด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ความถี่ของแอนติเจน JENU ในประชากรคนไทย และ glycoporphins ที่ทำให้เกิดผลลบปลอมในการตรวจแอนติเจน s ด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER

ชนิด hybrid glycoporphins	homozygous <i>GYP*Mur</i> (JENU-)	heterozygous <i>GYP*BS/GYP*Bun</i>	heterozygous <i>GYP*Mur/GYP*Bun</i>	homozygous <i>GYP*Bun</i>
ความถี่ในตัวอย่างที่ไม่มีอาการแสดงออกของ GPB (%)	81.6 (49/60)	8.3 (5/60)	6.6 (4/60)	3.3 (2/60)
ความถี่ในประชากร (10x8xn/10,000%)	0.65	0.07	0.05	0.03

บทที่ 5

สรุปผลงานวิจัยและอภิปรายผล

5.1 อภิปรายผล

หมู่โลหิตระบบ MNS เป็นหมู่โลหิตที่มีแอนติเจนจำนวนมาก มีความหลากหลาย และซับซ้อนในการแสดงออกของแอนติเจนสูง เนื่องจากยีนที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจน ได้แก่ *GYP*A*, *GYP*B* และ *GYP*E* มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 95 จึงทำให้เพิ่มโอกาสในการเกิด gene recombination และทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน ส่งผลให้เกิด hybrid glycoporphin ซึ่งเป็น MNS variant phenotypes ต่างๆได้หลากหลายชนิด รวมทั้งสามารถพบแอนติเจนชนิดใหม่ในกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน(4)

hybrid glycoporphins GP(B-A-B) พบได้น้อยมากในกลุ่มคนผิวขาว แต่จะพบมากในประชากรเชื้อสายเอเชีย(6) โดย hybrid glycoporphins (B-A-B) สามารถแบ่งออกเป็น 5 ชนิด ตามความยาวของ *GYP*A* ที่แทรกใน *GYP*B* และตำแหน่งที่แทรก ประกอบด้วย GP.Mur, GP.Kip, GP.HF, GP.Bun และ GP.Hop โดยจะพบ GP.Mur มากที่สุดในทุกเชื้อชาติ แต่ละ GP มีการสร้างแอนติเจน 5 ชนิด ได้แก่ Mi^a, Mur, Hil, MINY และ MUT ในประเทศไทยพบแอนติบอดีต่อกลุ่ม

GP.Mur มากที่สุด ซึ่งแอนติเจนแต่ละชนิด สามารถกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีจำเพาะได้ ตรวจพบได้ ทั้งในผู้ป่วย ผู้บริจาคโลหิต และจากการตั้งครรภ เป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก แต่การตรวจแยกแอนติเจนจำเพาะแต่ละชนิดไม่สามารถทำได้ในงานประจำวันทั่วไปทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากข้อจำกัดของ แอนติซีรัมต่อ low incidence antigens กลุ่มนี้หายได้ยาก ไม่มีขายในท้องตลาด จึงมีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยา มาศึกษาสารพันธุกรรมของ hybrid glycoprotein ชนิดต่างๆ เพื่อใช้แยกชนิดแอนติเจนเหล่านี้บนเม็ดเลือดแดงแทน

เปรียบเทียบผลการศึกษาโดย Jongruamklang P และคณะ(20) ศึกษาในประชากรคนไทย ที่มีผลการตรวจ phenotype Mi(a+) ทั้งหมด 63 ราย ร้อยละ 92 (58 จาก 63 ตัวอย่าง) มีการแสดงออกของ GPB ปกติ ซึ่งคาดว่าเป็น heterozygous hybrid glycoprotein เช่น GYP^*B/GYP^*Mur ในขณะที่ร้อยละ 8 (5 จาก 63 ตัวอย่าง) ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ โดยพบว่าตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกตินั้น ร้อยละ 75 (3 จาก 5 ตัวอย่าง) เป็น homozygous GYP^*Mur และร้อยละ 25 (2 จาก 5 ตัวอย่าง) เป็น heterozygous $GYP^*Mur/Bun-like$ (ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับ Chinese variant มากกว่า reference sequence) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิจัยนี้ จะพบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมด 60 ราย เป็นตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติทั้งหมด สังเกตได้จากการเกิดผลลบปลอมในการตรวจด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER ส่วนใหญ่เป็น homozygous GYP^*Mur และพบ heterozygous GYP^*Mur/GYP^*Bun เช่นเดียวกัน

นอกเหนือจากนี้ การศึกษานี้พบ homozygous GYP^*Bun และ heterozygous GYP^*BS/GYP^*Bun อีกด้วย ทั้งนี้ การศึกษาโดย Palacajornsuk และคณะ(23) ศึกษาความถี่ของ hybrid glycoproteins ในประชากรคนไทยโดยใช้เทคนิค PCR-SSP พบว่าในประชากรคนไทย ร้อยละ 7.97 เป็น GP.Mur และร้อยละ 1.06 เป็น GP.Bun ซึ่งพบว่าความถี่ของ GP.Bun ในประชากรคนไทยนั้นค่อนข้างสูงกว่าประชากรอื่นๆและชาวเอเชีย โดยในคนจีนพบ GP.Bun เพียงร้อยละ 0.06(9) การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่มีการค้นพบรูปแบบ homozygous GYP^*Bun ในประชากรคนไทย โดยพบว่า GYP^*Bun ที่พบส่วนใหญ่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Chinese variant (KR363627.1)(9) ซึ่งสนับสนุนถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อชาติจีนและไทยมีความใกล้ชิดกัน

การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นถึงความถี่ของรูปแบบ genotyping ของหมู่เลือด MNS ชนิด hybrid glycoporphin ในกลุ่มตัวอย่างที่ทำให้เกิดผลการตรวจแอนติเจน s ลบปลอมด้วยการตรวจด้วยน้ำยา monoclonal IgM clone P3BER โดยเฉพาะแอนติเจน JENU ลบ เมื่ออนุมานร่วมกับความถี่ของแอนติเจน Mi(a+) ในประชากรคนไทย ร้อยละ 10(23) และโอกาสพบตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ เป็นร้อยละ 8 ของประชากรที่มีแอนติเจน Mi(a+) นั้น (20) จึงสรุปได้ว่า ความถี่ของ homozygous *GYP*Mur* (JENU-) ในประชากรคนไทย ได้แก่ ร้อยละ 0.67 และความถี่ของ hybrid glycoporphin อื่นๆ ร้อยละ 0.13 ซึ่งลักษณะของ hybrid glycoporphins ชนิดอื่นๆที่พบนั้น อาจทำให้เกิดการสร้าง alloantibody ที่แตกต่างจาก anti-JENU ได้เนื่องจากมีลำดับโปรตีนที่แตกต่างกัน เช่น GP.Mur และ GP.Bun มีกรดอะมิโนแตกต่างกันที่ตำแหน่ง 27 จาก Arginine เป็น Threonine(25) ซึ่งจะเห็นว่าในประชากรคนไทยภาคเหนือ มีความถี่ของแอนติเจน Mi(a+) สูงกว่าคนภาคกลาง คือร้อยละ 22 ดังแสดงในตารางที่ 5(23) เมื่ออนุมานความถี่ของ homozygous *GYP*Mur* (JENU-) จะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 1.4 และความถี่ของ hybrid glycoporphin อื่นๆ ร้อยละ 0.3 ดังนั้น ดังนั้น ผู้ป่วยคนไทยภาคเหนือจึงมีความเสี่ยงในการสร้างแอนติบอดีต่อ hybrid glycoporphin มากกว่าคนไทยภาคกลาง ส่งผลต่อปัญหาการรักษาโลหิตให้กับผู้ป่วย รวมถึงโอกาสที่จะพบผลลบปลอมในการตรวจแอนติเจน s ด้วยน้ำยา monoclonal IgM clone P3BER สูงกว่าในคนภาคกลาง ซึ่งห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีความตระหนักถึงข้อจำกัดของน้ำยาที่ใช้ เพื่อป้องกันการแปลผลแอนติเจนผิดและนำโลหิตที่ไม่เหมาะสมไปให้กับผู้ป่วยได้

ปัจจุบันการให้โลหิตกับผู้ป่วยที่มีการสร้าง anti-JENU อ้างอิงจากผลการตรวจแอนติเจน s เท่านั้น จากผลการศึกษานี้ ทำให้ทราบว่าผลการตรวจแอนติเจน s ไม่เพียงพอต่อการยืนยันว่าผู้บริจาครายนั้นเป็นแอนติเจน JENU- จริง ซึ่งมีความเสี่ยงต่อผู้ป่วย อาจได้รับโลหิตที่ไม่เหมาะสมและเกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์หลังรับโลหิต ดังนั้นจากผลการทำ genotyping ด้วยวิธี PCR HRM พบว่าวิธีการดังกล่าว สามารถใช้บ่งชี้ ผู้บริจาคโลหิตที่มีแอนติเจน JENU- ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อวิเคราะห์ผลร่วมกับการตรวจแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงด้วย anti-s IgG antibody ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Jongruamklang P และคณะ(20) ซึ่งมีการนำตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ ทำการวัดปริมาณการแสดงออกของแอนติเจน s ด้วยน้ำยา monoclonal IgM clone P3BER เปรียบเทียบกับน้ำยา polyclonal โดยใช้เทคนิค flow

cytometry พบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ นั้น มีปริมาณการแสดงออกของ แอนติเจน s ลดลงอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำยา monoclonal IgM clone P3BER และแสดงออกปกติ โดยน้ำยา polyclonal

อย่างไรก็ดีในการศึกษานี้มีข้อจำกัดหลายอย่าง ประการแรก คือ จำนวนตัวอย่างที่น้อยเกินไปซึ่งไม่สามารถทำให้ระบุเป็นความถี่ของแอนติเจนในประชากรที่แท้จริงได้ จำเป็นต้องอนุมานจากความถี่ของแอนติเจน Mi(a+) ในประชากรร่วมกับโอกาสพบตัวอย่างที่ไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ ในประชากร Mi(a+) เพื่อคำนวณความถี่ของแอนติเจน JENU- ประการที่สอง primers ที่ใช้สามารถเพิ่มจำนวน non homozygous *GYP*^{Mur}* ได้ แต่กระนั้น ผู้วิจัยจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคอื่นๆ ช่วยในการระบุชนิดของ hybrid glycoporphin ชนิดอื่นๆ เนื่องด้วยขาดตัวอย่างที่ทราบชนิดของ hybrid glycoporphins มาเปรียบเทียบกับค่า T_m

จากผลการศึกษาที่พบรูปแบบ hybrid glycoporphin (B-A-B) ชนิดอื่นๆ ได้แก่ heterozygous *GYP*^{Mur}/*GYP*^{Bun}**, homozygous *GYP*^{Bun}* และ heterozygous *GYP*^{BS}/*GYP*^{Bun}** สรุปได้ว่า รูปแบบ hybrid glycoporphin (B-A-B) ใดๆ ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของ pseudo exon 3 หรือเมื่อ GPB ที่มีการแสดงออกของแอนติเจน S ร่วมกับ hybrid glycoporphin จะทำให้เกิดผลลบปลอมในการตรวจแอนติเจน s ด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ประชากรชาวไทยมีความถี่ของแอนติเจน Mi(a+) สูงเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรทั่วโลก จึงมีโอกาที่จะพบผลลบปลอมจากการตรวจด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER สูงตามไปด้วย ดังนั้น การคัดเลือกน้ำยาและแปลผลการทดสอบ การตรวจ red cell phenotype จึงจำเป็นต้องพิจารณา clone น้ำยาที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้แปลผลแอนติเจน s ผิด เมื่อนำผู้บริจาคโลหิตที่บันทึกผลแอนติเจน s เป็นลบปลอมนี้มาทำปฏิกิริยากับ anti-s ของผู้ป่วยจะไม่สามารถเข้ากันได้ และอาจส่งผลให้การจัดหาโลหิตล่าช้าได้

จากผลการศึกษาที่พบว่าผู้บริจาคโลหิตจำนวนหนึ่งที่แอนติเจน JENU- นั้น ทำให้ผู้บริจาคโลหิตเหล่านั้น ถูกจัดอยู่ในกลุ่มผู้มีหมู่โลหิตหายาก ซึ่งทำให้ศูนย์รับบริจาคสามารถบริหารจัดการ เพื่อเตรียมโลหิตพิเศษเหล่านี้ไว้สำหรับผู้ป่วยที่พบการสร้าง anti-JENU ขึ้น ในขณะที่เดียวกัน เซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคกลุ่มนี้ยังสามารถนำมาจัดทำเป็นชุด panel cells พิเศษ สำหรับใช้ตรวจหา

แอนติบอดีต่อ low incidence antigens ได้อีกด้วย โดยตัวอย่างที่ตรวจพบว่าเป็น *GYP*^{Bun}* จะสามารถนำมาคัดกรอง anti-Hop และตัวอย่างที่เป็น homozygous *GYP*^{Mur}* จะให้ความแรงของปฏิกิริยาในการตรวจคัดกรอง anti-Mi^a มากกว่าตัวอย่างที่เป็น heterozygous *GYP*^{Mur}/*GYP*^B** (Dosage effect)(9) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานธนาคารเลือด เพื่อลดความเสี่ยงการเกิดอาการข้างเคียงจากการให้โลหิตในผู้ป่วย

การนำเทคนิคทางด้านโมเลกุลอณูชีววิทยามาใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดในโรงพยาบาลอาจมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ต้องอาศัยเครื่องมือและผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในงานด้านโมเลกุลอณูชีววิทยา ดังนั้นการนำเทคนิค ทางโมเลกุลอณูชีววิทยาไปใช้ในการตรวจหามูลโลหิตของผู้ป่วยหรือผู้บริจาค อาจเหมาะสำหรับการตรวจหาแอนติเจนในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ หรือศูนย์บริการโลหิตเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจยืนยันแอนติเจน JENU โดยใช้เทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยาทำได้ยาก จำเป็นต้องใช้น้ำยาหลายชนิดในการทดสอบและมีต้นทุนสูง อีกทั้งไม่สามารถระบุแอนติเจนได้อย่างชัดเจน เนื่องจากผลการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้น การตรวจแอนติเจน JENU โดยห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ หรือศูนย์บริการโลหิต โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล จึงมีความเหมาะสมเพื่อการจัดหาโลหิตรองรับผู้ป่วยที่มีการสร้างแอนติบอดี เทคนิค PCR HRM เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ใช้ระยะเวลาสั้นและมีความไวสูง สามารถทำการทดสอบตัวอย่างปริมาณมากในคราวเดียว ทั้งนี้

ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องประเมินเครื่อง thermocycler ที่ใช้ในการทดสอบและเปรียบเทียบค่า Tm ที่ได้กับตัวอย่างที่ทราบชนิด glycoporphins ในทุกครั้งที่ทำการทดสอบ เนื่องจากเครื่อง thermocycler ที่แตกต่างกัน อาจให้ลักษณะของ melting peak แตกต่างกัน และเนื่องจากค่า Tm ของ hybrid glycoporphins แต่ละชนิดแตกต่างกันน้อยมาก (น้อยกว่า 1°C) ดังนั้นความเที่ยงของการใช้ pipette ในการทดสอบมีผลอย่างมากในการแปลผลชนิดของ hybrid glycoporphins โดยใช้ค่า Tm ทั้งนี้พบว่า ในการศึกษานี้ ลักษณะของ melting peak ที่ได้ แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้เทคนิค PCR HRM ในการศึกษาชนิดของ hybrid glycoporphins เช่นเดียวกัน(9, 19, 29) โดยพิจารณาปัจจัยที่แตกต่างของการศึกษานี้และการศึกษาที่อ้างอิง พบว่าการศึกษานี้ใช้เครื่อง thermocycler LightCycle 480 (Roche) ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้ ใช้เครื่อง Rotor GeneQ (Qiagen) และค่า lamp rate ของงานวิจัยนี้ใช้ 0.02°C/s ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้ใช้ค่า lamp

rate 0.05°C/s ซึ่งเมื่อพิจารณาการเพิ่มอุณหภูมิที่ช้ากว่า จะมีความไวที่สูงกว่า จึงคาดว่า ลักษณะของ melting peak ที่แตกต่างกันนั้นเกิดจากข้อจำกัดของเครื่อง thermocycler ที่ใช้ ทั้งนี้ การศึกษานี้สามารถแยกชนิดของ heterozygous hybrid glycophorins ได้จากลักษณะของ melting peak และค่า Tm ที่แตกต่างจากตัวอย่างที่เป็น homozygous เช่นเดียวกัน

ในการศึกษานี้ได้นำตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจแอนติเจน s ลบด้วย monoclonal IgM clone P3BER มาทดสอบยืนยันด้วยน้ำยา polyclonal IgG ร่วมกับผลการตรวจแอนติเจน Mi(a+) เพื่อระบุว่าตัวอย่างนั้นไม่มีการแสดงออกของ GPB ปกติ แต่ทั้งนี้ ความถี่ของแอนติเจน s ลบในประชากรชาวไทยต่ำกว่าร้อยละ 2(8) ซึ่งจัดเป็นแอนติเจนที่หาได้ยาก ดังนั้น เพื่อลดขั้นตอนและต้นทุนในการนำเทคนิคโมเลกุลอณูชีววิทยาไปใช้ในการตรวจชนิดของ hybrid glycophorins สามารถนำตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจแอนติเจน s ลบด้วย monoclonal IgM clone P3BER มาทดสอบ PCR HRM ได้เลย โดยไม่มีความจำเป็นต้องทดสอบยืนยันด้วย polyclonal IgG ทำการทดสอบในตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) เพื่อประเมินความเที่ยงตรงของค่า Tm ที่ได้

5.2 สรุปผลงานวิจัย

5.2.1 จากงานวิจัยนี้ พบว่าความถี่ของแอนติเจน JENU- ในประชากรคนไทย เมื่ออนุมานเทียบกับความถี่ของแอนติเจน Mi(a+) ร้อยละ 10 และโอกาสที่พบความผิดปกติของการแสดงออก GPB ปกติ ร้อยละ 8 ในกลุ่มแอนติเจน Mi(a+) จะได้ความถี่ของแอนติเจน JENU- ร้อยละ 0.65

5.2.2 รูปแบบ hybrid glycoprotein อื่นๆ นอกเหนือจาก homozygous *GYP*^{Mur}(JENU-)* ที่ทำให้เกิดผลลบปลอมในการตรวจแอนติเจน s ด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER ในประชากรคนไทยได้แก่ heterozygous *GYP*^{Mur}/*GYP*^{Bun}**, homozygous *GYP*^{Bun}* และ heterozygous *GYP*^{BS}/*GYP*^{Bun}**

5.2.3 เทคนิค PCR HRM เหมาะสมต่อการใช้ทดสอบ hybrid glycoprotein ในประชากรคนไทย ทั้งนี้ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะและความเชี่ยวชาญในการปฏิบัติการและแปลผล

5.3 ข้อเสนอแนะ

การทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา เช่น แอนติเจน Hop, Mur, JENU และ MUT เป็นต้น เพื่อระบุชนิดของ hybrid glycoprotein จะสนับสนุนผลการวิจัยที่ตรวจทางโมเลกุล สนับสนุนให้งานวิจัยนี้มีคุณค่าและสมบูรณ์มากขึ้น ทั้งนี้ด้วยข้อจำกัดของน้ำยาแอนติซีรัมที่หาได้ยาก และการติดตามตัวอย่างเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตมาทดสอบเพิ่มเติม ทำให้งานวิจัยนี้ยังขาดข้อมูลทางน้ำเหลืองวิทยา แต่กระนั้น การทดสอบ Sanger sequencing ค่อนข้างมีความถูกต้อง แม่นยำสูง

5.4 งานวิจัยในอนาคต

ในงานวิจัยนี้พบว่าผู้บริจาคโลหิตชาวไทยที่มีการแสดงออกของแอนติเจน S จะทำให้มีการแสดงออกของ GPB ที่ผิดปกติ เมื่อผู้บริจาครายนั้นมี hybrid glycoprotein GP.Bun ร่วมด้วย จะทำให้เกิดผลบดบังในการตรวจแอนติเจน s ด้วยน้ำยา anti-s monoclonal IgM clone P3BER เป็นที่น่าสนใจว่าสามารถเกิดการแสดงออกของ GPB ผิดปกติเมื่อมี hybrid glycoprotein ชนิดอื่นๆ หรือไม่ เช่น GP.Mur จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างในการศึกษาเพิ่มเติมและต้องใช้เทคนิค sequencing ในการระบุชนิดของ glycoproteins นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ มีแนวความคิดเริ่มต้นจากการพบว่าคุณสมบัติของประชากรคนไทยที่มีแอนติเจน Mi(a+) สูงกว่าประชากรอื่น จึงมีความสำคัญทางคลินิกชัดเจน แตกต่างจากเชื้อชาติอื่น และจัดเป็นจุดเด่นของงานวิจัยนี้ ที่มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ hybrid glycoprotein ซึ่งเชื้อชาติอื่นมีการศึกษาน้อย ด้วยปริมาณของตัวอย่างหาได้ยาก ในขณะที่ในประเทศไทยสามารถหาตัวอย่างได้เพียงพอ แต่กลับมีการศึกษา hybrid glycoprotein น้อยเช่นกัน เนื่องจากข้อจำกัดของเทคโนโลยีและผู้มีความถนัดด้านเวชศาสตร์ธนาคารเลือดค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึง คุณสมบัติน้ำเหลืองของแอนติเจนที่เป็นชนิด low-incidence antigen ที่เกี่ยวข้องกับระบบ MNS ตัวอื่นๆที่พบได้ในประชากรคนเอเชียสูงกว่าเชื้อชาติอื่นๆ เช่น St^a (GP.Sch) พบในประชากรชาวไต้หวันร้อยละ 3.03(30) เป็นแอนติเจนที่มีความผิดปกติของยีน hybrid glycoprotein (B-A) ที่ตำแหน่ง intron 3 ซึ่งอาจเป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญทางคลินิกในการรับโลหิตของประชากรคนไทย และไม่มีน้ำยาสำเร็จรูปที่สามารถตรวจได้ นอกจากนี้ แอนติเจนที่น่าสนใจในประชากรคนไทย ได้แก่ s^D(MNS 23) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่หาได้ยากในประชากรทั่วโลก โดยพบเพียง 1 รายในประชากร

ผิวขาวชาวแอฟริกันใต้เท่านั้น(6) แต่เมื่อไม่นานมานี้พบว่าผู้ป่วยทารกแรกคลอดชาวไทย ที่เกิดภาวะซีดหลังคลอดรุนแรง ซึ่งเมื่อทำการสุ่มทดสอบพลาสมาของมารดากับเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคชาวไทยหมู่โลหิต O จำนวน 100 ราย พบว่าทำปฏิกิริยา 2 ราย (ร้อยละ 2) ส่งตัวอย่างตรวจยืนยันที่กาชาดออสเตรเลียพบว่าเกิดจากแอนติเจน s^D ซึ่งปัจจุบันอยู่ระหว่างการร่างบทความเพื่อเผยแพร่ เป็นที่น่าสนใจว่าแอนติเจน s^D ที่พบได้ยากในประชากรทั่วโลกนี้ อาจมีความถี่ในประชากรคนไทยสูงกว่าเชื้อชาติอื่นๆได้ การพัฒนาเทคนิคที่ใช้เพื่อตรวจแอนติเจนในกลุ่ม low – incidence antigen ในหมู่โลหิต MNS ในผู้บริจาคโลหิต จึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจและแปลกใหม่ มีความจำเพาะเหมาะสมต่อคนไทยค่อนข้างสูง และหากสามารถนำไปพัฒนาในการตรวจประจำของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติได้ จะทำให้โลหิตที่จ่ายให้กับผู้ป่วยทั่วประเทศมีความปลอดภัยยิ่งขึ้น



บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พลอยมณี สุวรรณวุฒิชัย
วัน เดือน ปี เกิด	13 มีนาคม 2534
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	67/119 หมู่ 6 ถนนกาญจนาภิเษก ตำบลเสาธงหิน อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี 11140
ผลงานตีพิมพ์	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suwanwootichai P, Panyasuppakul S, Srinag N and Phiencharoen. Comparison of IgG antibody titers using conventional tube technique and automated column agglutination test. Journal of Hematology and Transfusion Medicine. Vol. 30 No. 4: October-December 2020. 2. Suwanwootichai P. Pre-transfusion testing for patients receiving the Daratumumab. Journal of Hematology and Transfusion Medicine. Vol. 28 No. 4: October-December 2018. 3. Suwanwootichai P. A severe haemolytic transfusion reaction caused by anti-Lea active at 37°C. J Hematol Transfus Med Vol. 30 No. 1 January-March 2020

1. Lublin DM SLeB, MD. Functional roles of blood group antigens. In: molecular and functional aspects of blood group antigens. American Association of Blood Banks. 1995:163-92.
2. Allaway GP, Burness AT. Site of attachment of encephalomyocarditis virus on human erythrocytes. J Virol. 1986;59(3):768-70.
3. Lomas-Francis C. Miltenberger phenotypes are glycoporphin variants: a review. ISBT Science Series. 2011;6(2):296-301.
4. Palacajornsuk P. Review: molecular basis of MNS blood group variants. Immunohematology. 2006;22(4):171-82.
5. <http://www.isbtweb.org>. The International Society of Blood Transfusion. Red cell immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party; 2021.
6. Reid ME L-FC, Olsson ML. . The blood group antigen: FactsBook 3, editor. Boston: Academic Press; 2012.
7. Wu KH, Chu SL, Chang JG, Shih MC, Peng CT. Haemolytic disease of the newborn due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan. Transfus Med. 2003;13(5):311-4.
8. Juthatip F IN, Suphawan Y, Pawinee K and Charal K. Blood Group in Thai Donors. Thai Journal of Hematology and Transfusion Medicine. 2002;12.
9. Wei L, Lopez GH, Zhang Y, Wen J, Wang Z, Fu Y, et al. Genotyping analysis of MNS blood group GP(B-A-B) hybrid glycoporphins in the Chinese Southern Han population using a high-resolution melting assay. Transfusion. 2018;58(7):1763-71.
10. Huynh NT, Ford DS, Duyen TT, Huong MT. Jk and Mi.III phenotype frequencies in North Vietnam. Immunohematology. 2003;19(2):57-8.
11. Hsu K, Kuo MS, Yao CC, Cheng HC, Lin HJ, Chan YS, et al. The MNS glycoporphin variant GP.Mur affects differential erythroid expression of Rh/RhAG transcripts. Vox Sang. 2017;112(7):671-7.
12. Emthip M SA, Patrungsi Y, Suwanwootichai P, Kupatawintu P. . Anti-Hop, a rare antibody of Miltenberger subclass in a Thai patient: a case report. J Hematol Transfus Med. 2014;24:41-5.

13. Janthaaksorn J EM, Kupatawintu P, Nathalang O, Charoonruangrit U and Bejrachandra S. Identification of a Rare Alloanti-GP.Hil (Anti-MNS20) in a Thai Patient: a case report. *J Hematol Transfus Med.* 2016;26:373-8.
14. Pawinee K ME, Duangporn S, Phuraya O, Vimol M, Sudawon L and Jintana T. Unexpected Antibodies of Patients, Blood Samples Sent for Testing at NBC.TRCS. *J Hematol Transfus Med.* 2010:20.
15. Lee C-k, Ma E, Tang M, Lam KC, Lin C, Chan L. Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in Chinese women during pregnancy - A review of cases from 1997 to 2001. *Transfusion Medicine.* 2003;13:227-31.
16. Sarisa C N, Wiradee S, Kamphon I and Oytip N. Prevalence and Specificity of Red Cell Alloantibodies in Repeated Antibody Screening among Thai Blood Donors. *J Med Tech Assoc Thailand.* 2018;46:6243-51.
17. Broadberry RE, Lin M. The incidence and significance of anti-"Mia" in Taiwan. *Transfusion.* 1994;34(4):349-52.
18. Reid M. MNS blood group system: A review. *Immunohematology / American Red Cross.* 2009;25:95-101.
19. Lopez GH, Wilson B, Liew YW, Kupatawintu P, Emthip M, Hyland CA, et al. An alloantibody in a homozygous GYP**Mur* individual defines JENU (MNS49), a new high-frequency antigen on glycoprotein B. *Transfusion.* 2017;57(3):716-7.
20. Jongruamklang P, Grimsley S, Thornton N, Robb J, Olsson ML, Storry JR. Characterization of GYP**Mur* and novel GYP**Bun*-like hybrids in Thai blood donors reveals a qualitatively altered s antigen. *Vox Sanguinis.* 2020;n/a(n/a).
21. Farhud DD, Zarif Yeganeh M. A brief history of human blood groups. *Iran J Public Health.* 2013;42(1):1-6.
22. Thornton N, Karamatic Crew V, Tilley L, Green CA, Tay CL, Griffiths RE, et al. Disruption of the tumour-associated EMP3 enhances erythroid proliferation and causes the MAM-negative phenotype. *Nature Communications.* 2020;11(1):3569.
23. Palacajornsuk P, Nathalang O, Tantimavanich S, Bejrachandra S, Reid M. Detection of MNS hybrid molecules in the Thai population using PCR-SSP technique. *Transfusion medicine (Oxford, England).* 2007;17:169-74.

24. Hassan SN, Thirumulu Ponnuraj K, Mohamad S, Hassan R, Wan Ab Rahman WS. Molecular Detection of Glycophorins A and B Variant Phenotypes and their Clinical Relevance. *Transfus Med Rev.* 2019;33(2):118-24.
25. Kaito S, Suzuki Y, Masuno A, Isa K, Toyoda C, Onodera T, et al. Frequencies of glycophorin variants and alloantibodies against Hil and MINY antigens in Japanese. *Vox Sanguinis.*n/a(n/a).
26. Chollanot Kaset SN, Nipapan Leetrakool and Oytip Nathalang. Detection of MNS Hybrid Molecules (GP.Hut, GP.Mur, GP.Hop, GP.Bun and GP.HF) in Central and Northern Thai Blood Donors. *J Hematol Transfus Med.* 2015;25.
27. Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G, Strapagiel D. High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11).
28. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest.* 2020;32(6):767-75.
29. Lopez GH, Wilson B, Turner RM, Millard GM, Fraser NS, Roots NM, et al. Frequency of Mi^a (MNS7) and Classification of Mi^a-Positive Hybrid Glycophorins in an Australian Blood Donor Population. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2020;47(4):279-87.
30. Shih MC, Yang LH, Wang NM, Chang JG. Genomic typing of human red cell miltenberger glycophorins in a Taiwanese population. *Transfusion.* 2000;40(1):54-61.

ภาคผนวก ก
ตัวอักษรย่อที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	อักษรย่อ	คำเต็มของอักษรย่อ
1	PCR	Polymerase Chain Reaction
2	DNA	Double Strain Nucleic Acid
3	Tm	Melting temperature
4	GP	Glycophorin
5	PCR-SSP	Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Primers
6	PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism
7	MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
8	HRM	High Resolution Melting
9	conc	concentration

ภาคผนวก ข

ความเข้มข้นของ DNA ตัวอย่าง

ข1. ตัวอย่างที่ทราบชนิดของ glycoporphins

No.	Sample No.	วันที่สกัด	DNA Conc. (ng/ μ l)	DNA ratio (260/280)	Phenotype/ Genotype	การเตรียม 10 ng (ปริมาตร 100 μ L)		DNA conc หลังเตรียม (ng/ μ L)
						DW	DNA	
1	10063504645	5 ส.ค. 63	27.20	1.81	Mi(a+) Heterozygous GYP* <i>Mur</i>	63.2	36.8	10.4
7	16072020	17 ก.ย. 63	139.20	1.9	JENU- Homozygous GYP* <i>Mur</i>	92.8	7.2	10.3
9	10062A81090	10 ก.ค. 63	41.7	1.91	Mi(a-) homozygous GYP* <i>B</i> /GYP* <i>B</i>	76.0	24.0	10.8

ข2. ตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตที่มีผลการตรวจ s ลบปลอมด้วยน้ำยา monoclonal IgM clone P3BER แต่ให้ผล s บวกด้วยน้ำยา polyclonal IgG และมีผลแอนติเจน MI(a+)

No.	Sample No.	วันที่สกัด	DNA Conc. (ng/ul)	DNA ratio (260/280)	phenotype	เตรียมเป็น 10 ng (ปริมาตร100uL)		DNA conc หลัง เตรียม (ng/uL)
						DW	DNA	
1	10063W04361	7/17/2020	41.60	1.79	MI(a+)S-s+	76.0	24.0	10.3
2	10063A85179	7/13/2020	31.20	1.76	MI(a+)S-s+	67.9	32.1	11.1
3	10063P04679	7/31/2020	48.30	1.88	MI(a+)S-s+	79.3	20.7	10
4	10063M85003	8/13/2020	22.8	1.78	MI(a+)S-s+	56.1	43.9	9.7
5	10063305002	8/13/2020	66.30	1.85	MI(a+)S-s+	84.9	15.1	12.7
6	10063Q34845	8/24/2020	76.90	1.87	MI(a+)S-s+	87.0	13.0	9.5
7	10063M88187	9/23/2020	69.4	1.83	MI(a+)S-s+	85.6	14.4	9.9
8	10063Q60279	9/23/2020	75.9	1.87	MI(a+)S-s+	86.8	13.2	9.4
9	10063Q60329	9/23/2020	109.1	1.79	MI(a+)S-s+	90.8	9.2	9.6
10	10063T06042	9/23/2020	84.3	1.84	MI(a+)S-s+	88.1	11.9	9.6
11	10063Q60822	9/23/2020	78.8	1.84	MI(a+)S-s+	87.3	12.7	8.7
12	10063M87645	9/23/2020	83.2	1.86	MI(a+)S-s+	88.0	12.0	9.7

No.	Sample No.	วันที่สกัด	DNA Conc. (ng/ul)	DNA ratio (260/280)	phenotype	เตรียมเป็น 10 ng (ปริมาตร100uL)		DNA conc ทิ้ง เตรียม (ng/uL)
						DW	DNA	
13	10063Q59809	9/23/2020	79.7	1.78	Mi(a+)S-s+	87.5	12.5	9.1
16	10063M88691	10/5/2020	100.2	1.9	Mi(a+)S-s+	90.0	10.0	13.9
17	10063N06237	10/5/2020	64.7	1.9	Mi(a+)S-s+	84.5	15.5	9.3
18	10063N06240	10/5/2020	99.8	1.91	Mi(a+)S-s+	90.0	10.0	8.9
19	10063Q73555	10/5/2020	108.4	1.9	Mi(a+)S-s+	90.8	9.2	8.5
20	10063Q89939	10/20/2020	77.2	1.86	Mi(a+)S-s+	87.0	13.0	12.4
21	10063P06835	10/20/2020	118.8	1.9	Mi(a+)S-s+	91.6	8.4	13.3
22	10063B06748	10/20/2020	46.8	1.86	Mi(a+)S-s+	78.6	21.4	10.6
23	100663F06775	10/20/2020	119.4	1.91	Mi(a+)S-s+	91.6	8.4	8.7
24	10063W07037	10/27/2020	82.2	1.82	Mi(a+)S-s+	87.8	12.2	12.4
25	10063106968	10/27/2020	95.2	1.83	Mi(a+)S-s+	89.5	10.5	12.1
26	10063Z19809	10/27/2020	92.4	1.86	Mi(a+)S-s+	89.2	10.8	11.5
27	10063306812	10/27/2020	88.4	1.9	Mi(a+)S-s+	88.7	11.3	13.9
28	10063Q9170	10/27/2020	83.7	1.79	Mi(a+)S-s+	88.1	11.9	13
29	10063P06974	10/27/2020	27.4	1.88	Mi(a+)S-s+	63.5	36.5	8

No.	Sample No.	วันที่สกัด	DNA Conc. (ng/ul)	DNA ratio (260/280)	phenotype	เตรียมเป็น 10 ng (ปริมาตร100uL)		DNA conc หลัง เตรียม (ng/uL)
						DW	DNA	
30	10063Q92566	10/27/2020	145.9	1.87	Mi(a+)S-s+	93.1	6.9	9.1
31	10063U06884	10/27/2020	84.6	1.87	Mi(a+)S-s+	88.2	11.8	14.2
32	10063Q93876	10/27/2020	115.8	1.71	Mi(a+)S-s+	91.4	8.6	7.3
33	10063U06739	10/27/2020	108.4	1.79	Mi(a+)S-s+	90.8	9.2	10
34	10063Q92639	10/27/2020	93.2	1.83	Mi(a+)S-s+	89.3	10.7	10.3
35	10063V05580	11/11/2020	70	1.84	Mi(a+)S-s+	85.7	14.3	10.6
36	10063V05185	11/11/2020	69.2	1.88	Mi(a+)S-s+	85.5	14.5	13.9
37	10063G07208	11/11/2020	63	1.84	Mi(a+)S-s+	84.1	15.9	10
38	10063807330	11/11/2020	67.9	1.8	Mi(a+)S-s+	85.3	14.7	11.5
39	10063207181	11/11/2020	97.6	1.75	Mi(a+)S-s+	89.8	10.2	14.2
40	10063M91637	11/16/2020	113.6	1.9	Mi(a+)S-s+	91.2	8.8	9.7
41	10063V10826	11/16/2020	46.4	1.92	Mi(a+)S-s+	78.4	21.6	10.9
42	10063V11957	11/16/2020	122.7	1.88	Mi(a+)S-s+	91.9	8.1	14.2
43	10063M15691	11/16/2020	46.5	1.91	Mi(a+)S-s+	78.5	21.5	9.2

No.	Sample No.	วันที่สกัด	DNA Conc. (ng/ul)	DNA ratio (260/280)	phenotype	เตรียมเป็น 10 ng (ปริมาตร100uL)		DNA conc หลัง เตรียม (ng/uL)
						DW	DNA	
44	10063H07395	11/16/2020	54.3	1.92	Mi(a+)S-s+	81.6	18.4	7.6
45	10063M91921	11/16/2020	59.7	1.87	Mi(a+)S-s+	83.2	16.8	13
46	10063V23918	12/1/2020	104	1.85	Mi(a+)S-s+	90.4	9.6	8.5
47	10063407630	12/1/2020	80	1.83	Mi(a+)S-s+	87.5	12.5	10.6
48	10063V24845	12/1/2020	89	1.9	Mi(a+)S-s+	88.8	11.2	12.7
49	10063407637	12/1/2020	62	1.79	Mi(a+)S-s+	83.9	16.1	10.8
50	10063Y07892	12/1/2020	97	1.83	Mi(a+)S-s+	89.7	10.3	13.3
51	10063V24996	12/1/2020	92	1.79	Mi(a+)S-s+	89.1	10.9	11.8
52	10063N07674	12/1/2020	84	1.82	Mi(a+)S-s+	88.1	11.9	11.5
53	10063Z23185	17/12/2020	70	1.88	Mi(a+)S-s+	85.7	14.3	8.8
54	10063V37300	17/12/2021	67.1	1.85	Mi(a+)S-s+	85.1	14.9	8.6
55	10063R08021	17/12/2022	96.2	1.86	Mi(a+)S-s+	89.6	10.4	8
56	10063V37842	17/12/2023	84.3	1.88	Mi(a+)S-s+	88.1	11.9	12.1
57	10063608200	17/12/2024	88.5	1.85	Mi(a+)S-s+	88.7	11.3	12.7

No.	Sample No.	วันที่สกัด	DNA Conc. (ng/ul)	DNA ratio (260/280)	phenotype	เตรียมเป็น 10 ng (ปริมาตร 100uL)		DNA conc หลัง เตรียม (ng/uL)
						DW	DNA	
58	10063V38922	17/12/2025	75.9	1.87	Mi(a+)S-s+	86.8	13.2	13
59	10063407655	12/1/2020	129	1.74	Mi(a+)S+s+	92.2	7.8	10
60	10063V23354	12/1/2020	89	1.79	Mi(a+)S+s+	88.8	11.2	13
61	10063V23910	12/1/2020	102	1.82	Mi(a+)S+s+	90.2	9.8	10.3
62	10063V24049	12/1/2020	91	1.81	Mi(a+)S+s+	89.0	11.0	10
63	10063V38327	17/12/2025	42.4	1.89	Mi(a+)S+s+	76.4	23.6	14.2

ภาคผนวก ค

ผลการ alignment ตัวอย่างที่ทราบชนิดของ glycoaphorins

PCR product	Alignment
homozygous GYP*B (A81090)	<p>GYP*B rs. NG_007483.2_ A81090 TCCAGCTCATACTGCTAATGAAGTTTCAGAAATTTCTGTACACTGTTCCCTCCAGAAAAGAAAACGGTATGTTCTTAGTTTTAAATAGTTTCTCTGGAGTCATTG TCCAGCTCATACTGCTAATGAAGTTTCAGAAATTTCTGTACACTGTTCCCTCCAGAAAAGAAAACGGTATGTTCTTAGTTTTAAATAGTTTCTCTGGAGTCATTG</p> <p>GYP*B rs. NG_007483.2_ A81090 TTGTGATTGAACCTTAATTTACACGAGCTGTAACCTAATGACAGTTCTCAAACTTTGGTGAC AGAAAACCCCACTCTTTTACTCCAAAGCCCC TTGTGATTGAACCTTAATTTACACGAGCTGTAACCTAATGACAGTTCTCAAACTTTGGTGAC AGAAAACCCCACTCTTTTACTCCAAAGCCCC</p>
heterozygous GYP*B/GYP*Mur (Q19006)	<p>GYP*B rs. NG_007483.2 GGGACACATGTCAGCTCATACTGCTAATGAAGTTTCAGAAATTTCTGTT AACTGTTTCCCTCCAGAAAAGAAAACGG---TATGTTCTTAGTTTTAATAGTTT- GYP*Mur rs. JN201202.2 GGGACACATACTCCAGCTCATACTGCTAATGAAGTTTCAGAAATTTCTGTT AGAACTGTTTCCCTCCAGAAAGAAAACCCGAGAAAAGGGACATTTTCCATGTTT- Q19006 GGGACACATACTCCAGCTCATACTGCTAATGAAGTTTCAGAAATTTCTGTT AGAACTGTTTCCCTCCAGAAAGAAAACCCG---TGTGTTCTTAGTTTTAATAGTTT- GYP*B rs. NG_007483.2 CTCTGGAGTCATTGTTGTAATGAACTCTAATTTACAGGAGCTGTAACCTCATGACAGTTCTCAAACTTTTGGTGACAGAAAACCCCAACTCTTTTACT GYP*Mur rs. JN201202.2 CTCTGTAAC-CAG----- Q19006 CTCTGGAGTCATTGTTGTAATGAACTCTAATTTACAGGAGCTGTAACCTCATGACAGTTCTCAAACTTTTGGTGACAGAAAACCCCAACTC-TTTTACT</p>
Homozygous GYP*Mur (Suchart)	<p>GYP*Mur rs. JN201202.2 GATAAGCACAAAACGGGACACATAI CCAGCTCATACTGCTAATGAAGTTTCAGAAATTTCTG Suchart GATAAGCACAAAACGGGACACATAI CCAGCTCATACTGCTAATGAAGTTTCAGAAATTTCTG</p>
Homozygous GYP*Mur (Suchart)	<p>GYP*Mur rs. JN201202.2 .GAAATTTCTGTTAGAACTGTTTACCCTCCAGAA GAGGAAAACCGG Suchart .GAAATTTCTGTTAGAACTGTTTACCCTCCAGAA GAGGAAAACCGG</p>

ภาคผนวก ง

ผลการทดสอบตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตจำนวน 60 รายมาศึกษา Genotyping ด้วยวิธี PCR HRM

และแปลผลชนิดของ glycophorins

ง1. ตัวอย่างที่แปลผลการทดสอบได้เป็น homozygous *GYP*^{Mur}* (JENU-) จำนวน 49 ราย

Sample No.	Phenotype	Tm1	Tm2	Tm3	Tmเฉลี่ย	แปลผล
10063W04361	S-s+Mi(a+)	79.79	79.77	79.79	79.78	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063A85179	S-s+Mi(a+)	79.83	79.79	79.82	79.81	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063P04679	S-s+Mi(a+)	79.9	79.86	79.9	79.89	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063305002	S-s+Mi(a+)	79.79	79.9	79.8	79.83	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063M88187	S-s+Mi(a+)	79.79	79.83	79.9	79.84	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063Q60279	S-s+Mi(a+)	79.84	79.78	79.78	79.80	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063Q60329	S-s+Mi(a+)	79.84	79.8	79.9	79.85	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063T06042	S-s+Mi(a+)	79.78	79.81	79.78	79.79	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063Q60822	S-s+Mi(a+)	79.78	79.75	79.75	79.76	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063M87645	S-s+Mi(a+)	79.78	79.79	79.9	79.82	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063Q59809	S-s+Mi(a+)	79.76	79.8	79.77	79.78	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063M88691	S-s+Mi(a+)	79.86	79.9	79.95	79.90	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063N06240	S-s+Mi(a+)	79.91	79.92	79.98	79.94	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063Q89939	S-s+Mi(a+)	79.77	79.74	79.79	79.77	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063P06835	S-s+Mi(a+)	79.78	79.75	79.88	79.80	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063B06748	S-s+Mi(a+)	79.86	79.87	79.96	79.90	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
100663F06775	S-s+Mi(a+)	79.78	79.72	79.85	79.78	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>
10063W07037	S-s+Mi(a+)	79.87	79.96	79.88	79.90	homozygous <i>GYP*^{Mur}</i>

Sample No.	Phenotype	Tm1	Tm2	Tm3	Tm เฉลี่ย	แปลผล
10063106968	S-s+Mi(a+)	79.88	79.81	79.87	79.85	homozygous GYP*(Mur)
10063Z19809	S-s+Mi(a+)	79.75	79.81	79.87	79.81	homozygous GYP*(Mur)
10063306812	S-s+Mi(a+)	79.8	79.81	79.87	79.83	homozygous GYP*(Mur)
10063N06237	S-s+Mi(a+)	79.49	79.48	79.49	79.49	homozygous GYP*(Mur)
10063Q99170	S-s+Mi(a+)	79.47	79.46	79.52	79.48	homozygous GYP*(Mur)
10063P06974	S-s+Mi(a+)	79.51	79.51	79.55	79.52	homozygous GYP*(Mur)
10063Q92566	S-s+Mi(a+)	79.5	79.45	79.44	79.46	homozygous GYP*(Mur)
10063Q93876	S-s+Mi(a+)	79.57	79.52	79.57	79.55	homozygous GYP*(Mur)
10063U06739	S-s+Mi(a+)	79.54	79.51	79.53	79.53	homozygous GYP*(Mur)
10063Q92639	S-s+Mi(a+)	79.5	79.52	79.5	79.51	homozygous GYP*(Mur)
10063V05580	S-s+Mi(a+)	79.54	79.51	79.54	79.53	homozygous GYP*(Mur)
10063V05185	S-s+Mi(a+)	79.5	79.49	79.45	79.48	homozygous GYP*(Mur)
10063207181	S-s+Mi(a+)	79.63	79.63	79.68	79.65	homozygous GYP*(Mur)
10063V10826	S-s+Mi(a+)	79.63	79.64	79.63	79.63	homozygous GYP*(Mur)
10063M15691	S-s+Mi(a+)	79.62	79.63	79.63	79.63	homozygous GYP*(Mur)
10063M91921	S-s+Mi(a+)	79.63	79.69	79.69	79.67	homozygous GYP*(Mur)
10063807330	S-s+Mi(a+)	79.65	79.65	79.68	79.66	homozygous GYP*(Mur)
10063M91637	S-s+Mi(a+)	79.5	79.54	79.48	79.51	homozygous GYP*(Mur)
10063V11957	S-s+Mi(a+)	79.48	79.5	79.5	79.49	homozygous GYP*(Mur)
10063H07395	S-s+Mi(a+)	79.51	79.5	79.5	79.50	homozygous GYP*(Mur)
10063V23918	S-s+Mi(a+)	79.55	79.57	79.66	79.59	homozygous GYP*(Mur)
10063407630	S-s+Mi(a+)	79.43	79.36	79.35	79.38	homozygous GYP*(Mur)

Sample No.	phenotype	Tm1	Tm2	Tm3	Tm เฉลี่ย	แปลผล
10063407637	S-s+Mi(a+)	79.41	79.45	79.49	79.45	homozygous GYP*(Mur)
10063Y07892	S-s+Mi(a+)	79.48	79.56	79.6	79.55	homozygous GYP*(Mur)
10063V24996	S-s+Mi(a+)	79.54	79.51	79.5	79.52	homozygous GYP*(Mur)
10063N07674	S-s+Mi(a+)	79.46	79.42	79.41	79.43	homozygous GYP*(Mur)
10063Z23185	S-s+Mi(a+)	79.4	79.5	79.51	79.47	homozygous GYP*(Mur)
10063V37300	S-s+Mi(a+)	79.56	79.56	79.58	79.57	homozygous GYP*(Mur)
10063R08021	S-s+Mi(a+)	79.49	79.5	79.51	79.50	homozygous GYP*(Mur)
10063V37842	S-s+Mi(a+)	79.43	79.39	79.4	79.41	homozygous GYP*(Mur)
10063608200	S-s+Mi(a+)	79.4	79.43	79.51	79.45	homozygous GYP*(Mur)
10063V38922	S-s+Mi(a+)	79.55	79.57	79.58	79.57	homozygous GYP*(Mur)



ง2. ตัวอย่างที่แปลผลการทดสอบได้เป็น non homozygous *GYP**Mur จำนวน 11 ราย

Sample No.	phenotype	Tm1	Tm2	Tm3	Tm เฉลี่ย	แปลผล
10063Q34845	S-s+Mi(a+)	79.79	79.75	79.74	79.76	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063M85003	S-s+Mi(a+)	79.44	79.41	79.4	79.42	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063Q73555	S-s+Mi(a+)	79.4	79.29	79.38	79.36	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063U06884	S-s+Mi(a+)	79.44	79.44	79.44	79.44	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063G07208	S-s+Mi(a+)	79.55	79.6	79.55	79.57	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063V24845	S-s+Mi(a+)	79.36	79.32	79.29	79.32	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063407655	S+s+Mi(a+)	79.37	79.33	79.31	79.34	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063V23354	S+s+Mi(a+)	79.3	79.27	79.26	79.28	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063V23910	S+s+Mi(a+)	79.27	79.3	79.37	79.31	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063V24049	S+s+Mi(a+)	79.22	79.24	79.3	79.25	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)
10063V38327	S+s+Mi(a+)	79.19	79.18	79.14	79.17	non homozygous <i>GYP*</i> (Mur)