

การตรวจสปี rs5896 ของยีน *prothrombin* ด้วยวิธี polymerase chain reaction และ high-resolution melting analysis

Detection of SNP rs5896 in *prothrombin* gene by polymerase chain reaction and high-resolution melting analysis

ชูชัย เนตรธวัชกุล¹ ัญญวรรณ รุ่งโรจน์² หนึ่งหทัย สวัสดิ์¹ นรินทรียา สุดตาชาติ³ และ เพทาย เย็นจิตโสมนัส^{1*}

Choochai Nettuwakul¹, Nanyawan Rungroj², Nunghathai Sawasdee¹, Nirinya Sudtachat³ and Pa-thai Yenchitsomanus^{1*}

¹หน่วยอนุเวชศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

²หน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

³หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10700

¹Division of Molecular Medicine, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700

²Division of Molecular Genetics, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700

³Medical Biotechnology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok 10700

*Corresponding author: grpye@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจสปี rs5896 ของยีน *prothrombin* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และ high-resolution melting (HRM) analysis โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากประชากรจังหวัดขอนแก่นที่ทราบจีโนไทป์แล้ว นำมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR และวิเคราะห์ด้วยวิธี HRM ผลการทดลองปรากฏว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ต่างๆ ได้ และทดสอบ sensitivity และ specificity ได้ค่า 100 เปอร์เซ็นต์ การใช้เทคนิคนี้จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ง่ายและรวดเร็ว สำหรับการตรวจสปี rs5896 ของยีน

prothrombin ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดนิวได ในคนไทยภาคอีสาน

ABSTRACT

We have developed the method for detection of SNP rs5896 in *prothrombin* gene by polymerase chain reaction (PCR) and high-resolution melting (HRM) analysis. The DNA samples from the Khon Kaen population with known genotypes were used for the detection by PCR amplification and HRM analysis. The result showed that SNP rs5896 could be

detected and the genotypes could be assigned. The sensitivity and specificity test were 100 %. Thus, PCR-HRM analysis is an alternative technique for simple and rapid detection of SNP rs5896 that associates with kidney stone disease in the Northeastern Thai population.

คำสำคัญ: สนิป, ยีน *prothrombin*, ยีน *F2*, เอชอาร์เอ็ม

Keywords: SNP, *prothrombin*, *F2*, HRM

บทนำ

ยีน *prothrombin* หรือ *coagulation factor II (F2)* อยู่บนโครโมโซมที่ 11 ตำแหน่ง 11p11-q12 ทำหน้าที่ ช่วยในกระบวนการแข็งตัวของเลือด (Royle *et al.*, 1987) โปรตีน *prothrombin* fragment 1 และ fragment 2 เป็นชิ้นส่วนที่ถูกตัดออกมาจากการเปลี่ยนโปรตีน *prothrombin* (inactive form) ให้เป็น *thrombin* (active form) มีรายงานว่า *prothrombin* fragment 1 ถูกขับออกมาทางปัสสาวะ และทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดก้อนนิ่ว และการขยายขนาดก้อนนิ่ว *CaOx* ได้ (Stapleton and Ryal, 1995) นอกจากนี้ในการศึกษายีนจำนวน 8 ยีน ที่สร้างโปรตีนยับยั้งการเกิดนิ่วไต พบว่ายีน *prothrombin* มีความเกี่ยวพัน (associated) กับการเป็นโรคนิ่วไตของคนไทยภาคอีสาน (Rungroj *et al.*, 2011) จึงได้ศึกษาต่อจนพบ functional SNP rs5896 (c.494 C>T: p. T165M) บนเอกซอนที่ 6 ของยีนซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก C เป็น T ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 165 ของโปรตีน (อยู่ในชิ้นส่วน *prothrombin* fragment 1) เปลี่ยนจากทรีโอ닌เป็นเมทไธโอนีน (Rungroj *et al.*, 2012) งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการหาจีโนไทป์ rs5896 ด้วยวิธี PCR-RFLP ซึ่งได้ผลดี แต่มีขั้นตอนการทำยุ่งยากและใช้เวลานาน ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิค

(high-resolution melting analysis; HRM) มาใช้ โดยเทคนิค HRM นี้ สามารถใช้ตรวจสอบความผิดปกติของยีน และใช้หาจีโนไทป์ของยีนต่างๆ ที่สนใจได้ (Wittwer *et al.*, 2003)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค HRM สำหรับหาจีโนไทป์ของสนิป rs5896 ให้ง่ายและรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกกลุ่มเสี่ยงต่อการเป็นโรคนิ่วไต และเป็นประโยชน์ในการศึกษาหน้าที่ของ *prothrombin* fragment 1 ต่อการเกิดนิ่วไตในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างดีเอ็นเอและไพรเมอร์ที่ใช้

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้ นำมาจากโครงการวิจัยโรคนิ่วไตในภาคอีสาน ซึ่งทราบจีโนไทป์ของสนิป rs5896 แล้ว โดยการทำให้ PCR-RFLP และการหาลำดับเบส (Rungroj *et al.*, 2012) ไพรเมอร์สำหรับทำ PCR ประกอบด้วยไพรเมอร์ F (5'-TTCTGCCGCAACCCCTGACAGC-3') และไพรเมอร์ R (5'-CCCAGCTTACCACAGACAGG-3') ซึ่งออกแบบสำหรับเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ขนาด 104 bp และครอบคลุมส่วนของสนิป rs5896 (Figure 1A)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ high-resolution melting (HRM)

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย genomic DNA 75 ng, 1x reaction buffer, 0.2 mM dNTPs, ไพรเมอร์ F และ R อย่างละ 1.0 μ M, HS Prime Taq (GENET BIO, Korea) 0.25 U และ 1X Resolight dye (Roche Diagnostics, Germany) ซึ่งเป็นสารฟลูออเรสเซนต์ ใช้สำหรับวัดปริมาณผลผลิต PCR และวัดการคลายเกลียวของผลผลิต PCR

ทำปฏิกิริยา PCR และ HRM ด้วยเครื่อง real-time PCR LightCycler 480 II (Roche

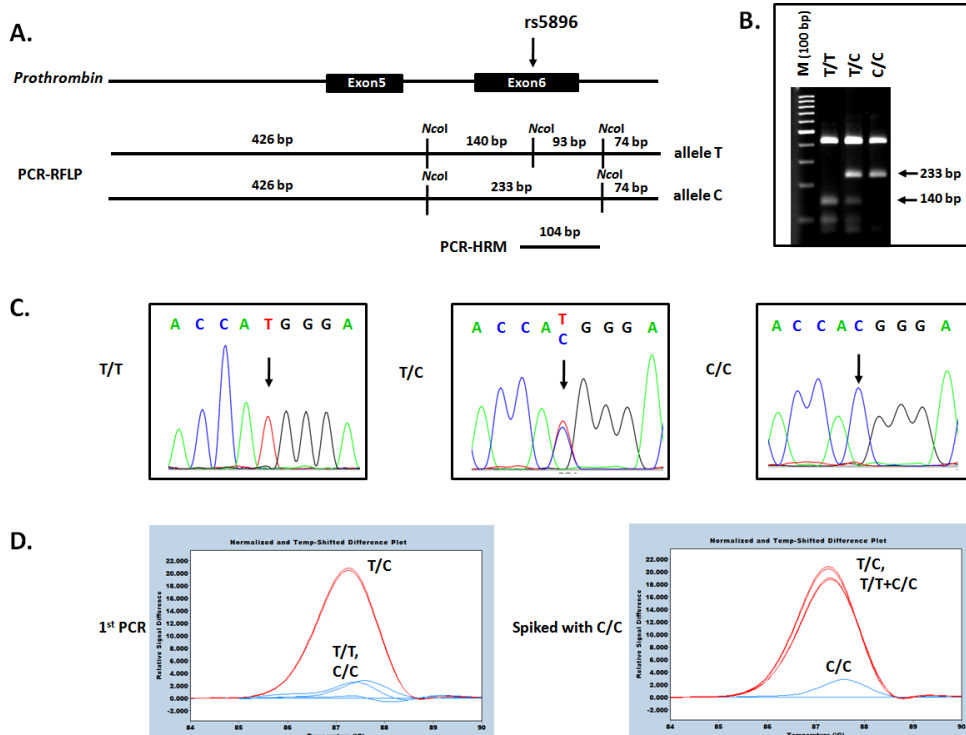


Figure 1 Genotyping of SNP rs5896 by PCR-RFLP, sequencing and PCR-HRM. The expected PCR products for PCR-RFLP (733 bp) and PCR-HRM (104 bp) were indicated as lines (A). The genotyping by PCR-PFLP (B) and DNA sequencing (C) showed all three genotypes T/T, T/C and C/C. In HRM analysis, heterozygous T/C could be distinguished from that of homozygous T/T and C/C in the 1st PCR. The T/T and C/C genotypes were not initially distinguishable from each other, but they were distinguishable after spiking with the C/C genotype (D). See color figure on the website.

Diagnostics, Germany) โดยเริ่มจากขั้นตอน pre-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 10 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 67 °C เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอน denaturing ถึง extension เป็นจำนวน 35 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการวิเคราะห์ HRM ประกอบด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที renaturing ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำ high-

resolution melting โดยค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 96 °C พร้อมทั้งวัดค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ จากนั้นวิเคราะห์ melting curve ของตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ T/T, T/C และ C/C และสร้าง difference plot โดยใช้โปรแกรม Gene Scanning 1.5.0 (Roche Diagnostics, Germany)

การทดสอบ sensitivity และ specificity

ทดสอบ sensitivity และ specificity ของการหาจีโนไทป์ rs5896 ด้วยเทคนิค HRM จาก

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีจีโนไทป์ T/C จำนวน 24 ตัวอย่าง และดีเอ็นเอที่มีจีโนไทป์ T/T จำนวน 24 ตัวอย่าง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าผลบวกจริง (true positivity) และผลบวกหลง (false positivity) ตามวิธีการคำนวณของ Norambuena *et al.* (2009)

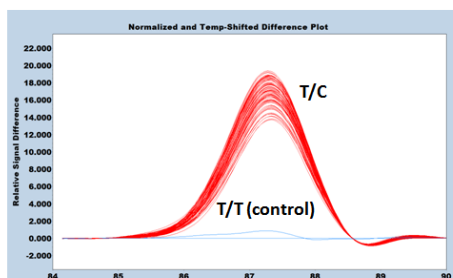
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทำปฏิกิริยา PCR และการวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่มีสปี rs5896 พบว่ามีลักษณะเฉพาะ เมื่อนำข้อมูลมาสร้าง difference plot พบว่าสามารถแยกจีโนไทป์ C/T จากจีโนไทป์อื่น แต่ไม่สามารถแยกจีโนไทป์ C/C และ T/T จากกันได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการทดลองเพิ่ม โดยเติมดีเอ็นเอที่มีจีโนไทป์ C/C ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่สอง ผลผลิต PCR ที่มีจีโนไทป์ T/T อยู่รวมกับ C/C จะเกิด heteroduplex และได้ difference plot เหมือนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ C/T เมื่อรวมผลการทดลองทั้งสอง ก็สามารถแยกจีโนไทป์ทั้ง 3 แบบ ออกจากกันได้ (Figure 1D) เมื่อเปรียบเทียบผลการหาจีโนไทป์ของสปี

rs5896 กับการทำ PCR-RFLP และการหาลำดับเบส พบว่าได้ผลสอดคล้องกัน (Figure 1A-D) การทดสอบ sensitivity โดยการทำ HRM กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีจีโนไทป์ T/C จำนวน 24 ตัวอย่าง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าผลบวกจริง พบว่าได้ผลบวกทุกครั้ง คำนวณค่า sensitivity ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดสอบ specificity โดยการทำ HRM กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีจีโนไทป์ T/T จำนวน 24 ตัวอย่าง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าผลบวกหลง พบว่าไม่ได้ผลบวกหลงเลย คำนวณค่า specificity ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2)

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ HRM สามารถใช้หาจีโนไทป์ของสปี rs5896 ในยีน *prothrombin* ได้ การที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของจีโนไทป์ homozygous T/T และ C/C ในการทำ HRM ครั้งเดียวได้ เนื่องจากการแยกความแตกต่างระหว่าง wild-type และ variant homoduplexes ทำได้ไม่ดีเท่ากับการแยกความแตกต่างระหว่าง homoduplex กับ heteroduplex ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ และ

A. Sensitivity test



B. Specificity Test

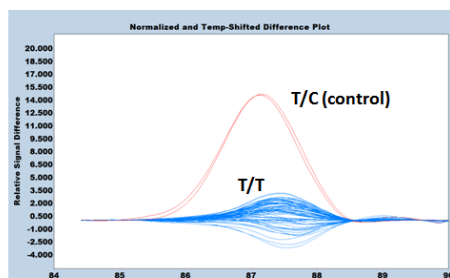


Figure 2 Sensitivity and specificity test for rs5896 genotyping by HRM analysis. All 24 samples with T/C genotype were positive, without false negativity (A) and all 24 samples with T/T genotype were not false positivity (B), thus, the sensitivity and specificity test were 100 %. See color figure on the website.

นิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในชั้นดีเอ็นเอที่วิเคราะห์นั้นด้วย (Wittwer *et al.*, 2003; Liew *et al.*, 2004; Nettuwakul *et al.*, 2010)

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการหาจีโนไทป์ของสเนป rs5896 ด้วยวิธี HRM ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายรวดเร็ว และสามารถหาจีโนไทป์ได้คร่าวละมากมาย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกกลุ่มเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ และเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาหน้าที่ของ prothrombin fragment 1 ต่อการเกิดหัวใจต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (RO15532006) และทุนเมธีวิจัยอาวุโส สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เพทาย เย็นจิตโสมนัส และ ญัณวรรณ รุ่งโรจน์ ได้รับทุนสนับสนุนจาก กองทุนเฉลิมพระเกียรติ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E and Wittwer C (2004) Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. Clin Chem 50: 1156–1164.

Nettuwakul C, Sawasdee N and Yenchitsomanus PT (2010) Rapid detection of solute carrier family 4, member 1 (SLC4A1) mutations and polymorphisms by high-resolution melting analysis. Clin Biochem 43: 497–504

Norambuena PA, Copeland JA, Krenková P, Stambergová A and Macek Jr M (2009) Diagnostic method validation: high resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the *MTHFR* gene. Clin Biochem 42: 1308–1316.

Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, Mac Gillivray RT and Hamerton JL (1987) Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11–q12 and 3q21–24, respectively. Somat Cell Mol Genet 13: 285–292.

Rungroj N, Sritippayawan S, Thongnoppakhun W, Paemanee A, Sawasdee N, Nettuwakul C, Sudtachat N, Ungsupravate D, Prahirunkit P, Chuawattana D, Akkrapatumwong V, Borvornpadungkitti S, Sussaengrat W, Vasuvattakul S, Malasit P and Yenchitsomanus PT (2011) Prothrombin haplotype associated with kidney stone disease in Northeastern Thai patients. Urology 77: 249.e17–23.

Rungroj N, Sudtachat N, Nettuwakul C, Sawasdee N, Praditsap O, Jungtrakoon P, Sritippayawan S, Chuawattana D, Borvornpadungkitti S, Predanon C, Sussaengrat W and Yenchitsomanus PT (2012) Association between human prothrombin variant (T165M) and kidney stone disease. PLoS One 7: e45533.

Stapleton AM and Ryall RL (1995) Blood coagulation proteins and urolithiasis are linked: crystal matrix protein is the F1 activation peptide of human prothrombin. Br J Urol 75: 712–719.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN,
Vandersteen JG and Pryor RJ (2003) High-
resolution genotyping by amplicon melting

analysis using LC Green. Clin Chem 49:
853–860.