

การพัฒนาเครื่องหมาย allele-specific PCR เพื่อระบุจีโนไทป์ของยีน *CYP2C9* Allele-Specific PCR Development for *CYP2C9* Genotyping

นุรฟา การาวาล¹ อรุณรัตน์ วณิชชานนท์^{2*} และอารีรัตน์ หนูนวล³
Nurfa Karawan¹ Arunrut Vanichanon^{2*} and Areerat Hnoonual³

บทคัดย่อ

CYP2C9 เป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาแอสไพริน ซึ่งยาแอสไพรินเป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือดที่มีช่วงการรักษาแคบ เนื่องจากภาวะพหุสัณฐานทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* มีผลต่อการตอบสนองต่อยาสูง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* ที่มีผลต่อระดับยาแอสไพรินในเลือด ได้แก่ *CYP2C9**2 (rs1799853) และ *CYP2C9**3 (rs1057910) ปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้ระบุความหลากหลายทางพันธุกรรม คือเทคนิค PCR-RFLP และ real-time PCR ซึ่งทั้งสองเทคนิคเป็นวิธีการที่มีราคาแพง มีหลายขั้นตอนและใช้ระยะเวลานาน คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิค allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) สำหรับระบุจีโนไทป์ของยีน *CYP2C9* โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังของ *CYP2C9**2 คือ แอปไวลด์ไทป์ แอปกลายพันธุ์ และแอปควบคุม มีขนาด 154 230 และ 346 คู่เบสตามลำดับ ส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังของ *CYP2C9**3 คือ แอปไวลด์ไทป์ แอปกลายพันธุ์ และแอปควบคุมมีขนาด 128 200 และ 289 คู่เบสตามลำดับ การหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้อุณหภูมิ annealing และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ แตกต่างกันพบว่า อุณหภูมิ annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.25 มิลลิโมลาร์เป็นสถานะที่เหมาะสม และยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Sanger DNA sequencing สรุปได้ว่าเทคนิค AS-PCR ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็ว ทำได้ง่ายและมีต้นทุนต่ำ ซึ่งสามารถระบุความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* เพื่อใช้ในการพิจารณาปรับขนาดยาแอสไพรินที่เหมาะสมสำหรับการรักษาได้

คำสำคัญ: ยาแอสไพริน ยีน *CYP2C9* AS-PCR

¹ สาขาวิชาชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

² สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

³ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

* Corresponding author e-mail: varunrut@hotmail.com

Received: 17 April 2020, Revised: 5 May 2020, Accepted: 6 May 2020

Abstract

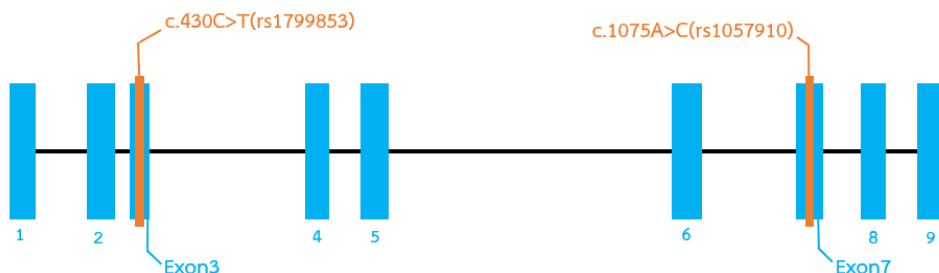
CYP2C9 is an enzyme that has effects on pharmacokinetics of warfarin, an anticoagulant drug. This drug is a narrow therapeutic index drug because genetic polymorphisms of *CYP2C9* have high effect on warfarin response. Genetic diversity of *CYP2C9* with effects on therapeutic drug of warfarin were *CYP2C9*2* (rs1799853) and *CYP2C9*3* (rs1057910). There are several methods available for genotyping such as PCR-RFLP and real-time PCR. However, both methods are expensive, manifold steps and time consuming. Hence, the researchers aimed to develop an allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) method for *CYP2C9* genotyping. The expected PCR products of *CYP2C9*2* were 154 bp (wild type allele), 230 bp (mutant allele) and 346 bp (control) whereas the expected PCR products of *CYP2C9*3* were 128 bp (wild type allele), 200 bp (mutant allele) and 289 bp (control). The PCR reaction was optimized by adjusting annealing temperatures and $MgCl_2$ concentration. The results revealed that annealing temperature at 65 °C and $MgCl_2$ 1.25 mM were the suitable PCR condition for both *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* genotyping. Sanger DNA sequencing method were used for result validation. In conclusion, AS-PCR developed in this study is a fast, simple and cost-effective technique to identify *CYP2C9* genotype for warfarin dosage adjustment which is appropriate for the treatment.

Keywords: warfarin, *CYP2C9* gene, AS-PCR

บทนำ

ยาต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ในกลุ่ม vitamin K antagonist โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้ง clotting factor II VII IX และ X โดยยาจะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ vitamin K epoxide reductase (VKORC) และยับยั้งปฏิกิริยา carboxylation ของ protein C และ protein S (Goldhaber *et al.*, 2013) เนื่องจากยาต้านการแข็งตัวของเลือดเป็นยาที่มีช่วงการรักษาแคบ (narrow therapeutic range) จึงต้องมีการติดตามการประเมินประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของยาอย่างสม่ำเสมอ โดยควบคุมค่า international normalized ratio (INR) ให้อยู่ในระดับ 2.5 ± 0.5 ยกเว้นกรณี mechanical prosthetic valves ที่มีความเสี่ยงสูงกว่าโดย therapeutic INR จะเท่ากับ 3.0 ± 0.5 (สมาคมแพทย์โรคหัวใจแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2553) เพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ปริมาณยาที่ไม่เหมาะสม โดยปริมาณยาที่มากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะเลือดออก และปริมาณยาน้อยเกินไปจะมีผลให้เลือดแข็งตัวเกิดการอุดตันเส้นเลือดในอวัยวะสำคัญ ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วย ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อยาต้านการแข็งตัวของเลือดมีทั้งปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อาหารที่มีปริมาณวิตามินเคสูง เพศ อายุ (สุทธิดา และคณะ, 2559) และปัจจัยด้านพันธุกรรม ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญ จากการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนมีผลต่อการตอบสนองของยา

วาร์ฟารินแตกต่างกันถึงร้อยละ 30-90 โดยยีนที่มีผลต่อการตอบสนองต่อยาวาร์ฟารินคือ ยีน *cytochrome P450 2C9 (CYP2C9)* และยีน *VKORC1* เป็นหลัก โดยยีน *VKORC1* เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเปลี่ยนรูปของวิตามินเคในกระบวนการออกซิเดชันรีดักชัน และยีน *CYP2C9* เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายยาวาร์ฟารินในตับ นอกจากนี้ *CYP2C9* ยังมีบทบาทในการย่อยสลายยาที่ใช้ทางคลินิกอีกหลายชนิด เช่น ยากันชัก (antiepileptic drugs เช่น phenytoin) ยาต้านการอักเสบแบบไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) เช่น celecoxib diclofenac ibuprofen mefenamic acid meloxicam naproxen และ piroxicam เป็นต้น (ชลภัทร, 2554) โดยภาวะพหุสัณฐานทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* ที่พบได้ทั่วไป คือ *CYP2C9*2* (c.430 C>T rs1799853) และ *CYP2C9*3* (c.1075A>C rs1057910) (ภาพที่ 1) ซึ่งพบในประชากรไทยในภาคใต้ 0 และ 8.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Maneechay *et al.*, 2017) และพบในชาวเอเชีย 0 และ 1.7-6.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (นิตยสุภา และสุทธิดา, 2560) บุคคลที่มีอัลลีล *CYP2C9*2* หรือ *CYP2C9*3* มีความต้องการขนาดยาวาร์ฟารินลดลงกว่าปกติ (Wattanachai *et al.*, 2017) การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนนิยมใช้เทคนิค PCR-RFLP และ real-time PCR โดยเทคนิค PCR-RFLP นั้นจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งมีราคาสูงและในขั้นตอนการย่อยผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต้องใช้เวลานาน ส่วนวิธี real-time PCR เป็นวิธีที่มีต้นทุนสูง และจำเป็นต้องใช้เครื่อง real-time PCR ด้วยข้อจำกัดของทั้งสองวิธีซึ่งมีความซับซ้อน ใช้เวลานาน รวมทั้งมีต้นทุนสูง แต่เนื่องจากสถานพยาบาลมีผู้รับบริการจำนวนมาก และบุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการที่ตรวจสอบ ความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย ผู้วิจัยจึงหาแนวทางตรวจสอบจีโนมไทป์ที่สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการที่ใช้เวลารวดเร็ว ลดขั้นตอนและสะดวกต่อทั้งผู้ให้บริการ ส่วนผู้รับบริการจะทราบผลการทดสอบเร็วขึ้น คือ การตรวจสอบจีโนมไทป์ของยีนด้วยเทคนิค allele-specific PCR ที่มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถใช้จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์พัฒนาเครื่องหมาย allele-specific PCR เพื่อระบุความหลากหลายของยีน *CYP2C9*



ภาพที่ 1 โครงสร้างของยีน *CYP2C9* และตำแหน่งสปีส์ *CYP2C9*2* (c.430C>T rs1799853) และ *CYP2C9*3* (c.1075A>C rs1057910)

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์แล้วจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับการยืนยันผลจีโนไทป์ด้วยวิธีมาตรฐาน Sanger DNA sequencing สกัดดีเอ็นเอจาก EDTA blood ด้วย QIAamp® DNA blood mini kit (Qiagen, CA, USA) หาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดสารพันธุกรรม eppendorf BioPhotometer plus วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *CYP2C9* ที่สนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*2* และ *CYP2C9*3* (ตารางที่ 1) ตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Vector NTI และ NCBI primer blast อีกทั้งคำนวณอุณหภูมิขั้น annealing แล้วหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์แล้ว ด้วยเทคนิค allele-specific PCR โดยกำหนดองค์ประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 2) และกำหนดสภาวะสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 3) สนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*2* กำหนดอุณหภูมิขั้น annealing ที่ 59 61 63, 65 และ 67 องศาเซลเซียส ส่วนสนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*3* กำหนดอุณหภูมิขั้น annealing ที่ 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์จำนวน 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) ที่สนิปส์ทั้ง 2 ตำแหน่งคือ *CYP2C9*2* และ *CYP2C9*3* ทดสอบโดยแยกคู่ไพรเมอร์สนิปส์ละ 3 คู่ คือ ไพรเมอร์คู่ควบคุม (wild type forward และ mutant reverse) ไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์ (wild type forward และ wild type reverse) และไพรเมอร์คู่กลายพันธุ์ (mutant forward และ mutant reverse) โดยตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 1 และ 2 ใช้ตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*2* ส่วนสนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*3* ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 1 2 และ 3 ในการทดสอบ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ด้วย 1XTAE ที่สภาวะ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้ UV transilluminator จีโนไทป์ของแต่ละรายจะอ่านตามขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ โดยเปรียบเทียบขนาดกับ DNA ladder และในทุกตัวอย่างจะมีแถบของ internal control เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังของสนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*2* คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 346 230 และ 154 คู่เบส โดยหากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 346 และ 154 คู่เบส หมายความว่าตัวอย่างดีเอ็นเอนั้นมีจีโนไทป์แบบ homozygous wild type (C/C) หากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 346 และ 230 คู่เบส หมายความว่าตัวอย่างดีเอ็นเอนั้นมีจีโนไทป์แบบ homozygous mutant (T/T) และหากปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 ขนาด คือ 346 230 และ 154 คู่เบส หมายความว่าตัวอย่างดีเอ็นเอนั้นมีจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation (C/T) (ภาพที่ 2 ก) ส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังของสนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*3* คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 289 200 และ 128 คู่เบส โดยหากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 289 และ 128 คู่เบส หมายความว่าตัวอย่างดีเอ็นเอนั้นมีจีโนไทป์แบบ homozygous wild type (A/A) หากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 289 และ 200 คู่เบส หมายความว่าตัวอย่างดีเอ็นเอนั้นมีจีโนไทป์แบบ homozygous mutant (C/C) และหากปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 ขนาด คือ 289 200 และ 128 คู่เบส หมายความว่าตัวอย่างดีเอ็นเอนั้นมีจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation (A/C) (ภาพที่ 2 ข) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเทคนิค allele-specific PCR มายืนยันผลโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายของยีน *CYP2C9*

สนิปส์	ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์ (5'-3')	ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (bp)
<i>CYP2C9*2</i>	CYP2C9*2_WF	GGGATCTCCCTCCTAGTTTCGT	154
(NM_000771.3: c.430C>T)	CYP2C9*2_WR	GGGCTTCCTCTTGAACCCG	
rs1799853	CYP2C9*2_MF	GAAGAGGAGCATTGAGGCCT	230
	CYP2C9*2_MR	GCAAATTCCTTGGCTCTCAG	
<i>CYP2C9*3</i>	CYP2C9*3_WF	GTCCAGGAAGAGATTGAACGTGT	128
(NM_000771.3: c.1075A>C)	CYP2C9*3_WR	CTGGTGGGGAGAAGGTCCAT	
rs1057910	CYP2C9*3_MF	GCACGAGGTCCAGAGATCCC	200
	CYP2C9*3_MR	GAGTTATGCACTTCTCTACCCG	

หมายเหตุ: internal control ของ *CYP2C9*2* ได้แก่ ไพรเมอร์ *CYP2C9*2_WF* กับ *CYP2C9*2_MR* ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 346 bp และ *CYP2C9*3* ได้แก่ ไพรเมอร์ *CYP2C9*3_WF* กับ *CYP2C9*3_MR* ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 289 bp

ตารางที่ 2 องค์ประกอบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

fraction	stock	final conc.	1X(10 µl)
distilled water	-	-	2.85 µl
PCR buffer	10X	1X	1 µl
betaine	5X	1X	2 µl
MgCl ₂	50 mM	1.25 mM	0.25 µl
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM	0.8 µl
forward primer	10 µl	1 µl	1 µl
reverse primer	10 µl	1 µl	1 µl
taq polymerase	5 U/µl	0.5 U	0.1 µl
total mastermix			9 µl
DNA	50 ng/µl	50 g	1 µl

ตารางที่ 3 สภาวะสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

steps	temp (°C)	time	cycle
initial denaturation	95	5 min	1 Cycle
denature	95	30 sec	repeat
annealing	*	30 sec	34
extension	72	30 sec	cycles
final extension	72	10 min	1
hold	15	forever	

หมายเหตุ: * กำหนดอุณหภูมิสำหรับ annealing ต่างกันคือ สนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*2* : 59 61 63 65 และ 67 องศาเซลเซียส และสนิปส์ตำแหน่ง *CYP2C9*3* : 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบคู่ไพรเมอร์ของสปีส์ *CYP2C9*2* และ *CYP2C9*3*

SNPs	คู่ไพรเมอร์	ขนาดแถบดีเอ็นเอ	ตัวอย่างดีเอ็นเอ		
		(bp)	1	2	3
<i>CYP2C9*2</i> (c.430C>T)	control	346	+	+	ไม่มี
	wild type	154	+	+	ตัวอย่างดี
	mutant	230	+	-	เอ็นเอ
<i>CYP2C9*3</i> (c.1075A>C)	control	289	+	+	+
	wild type	128	+	+	+
	mutant	200	-	-	+

หมายเหตุ: + หมายถึง พบแถบดีเอ็นเอ

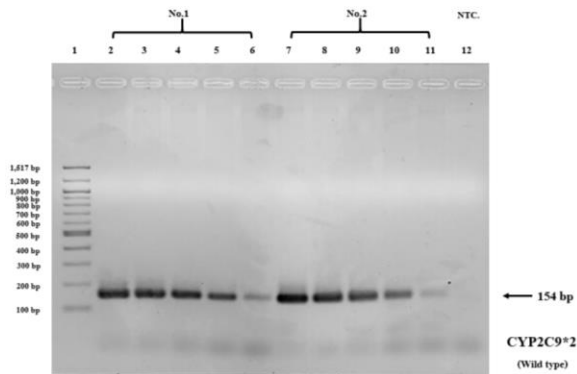
- หมายถึง ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

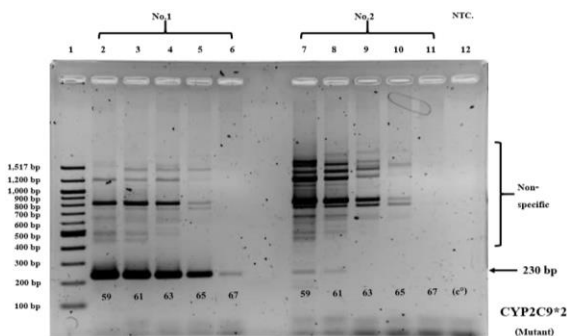
จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C9* ด้วยเครื่องหมาย allele-specific PCR โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 1 2 และ 3 (ตารางที่ 4) ที่สปีส์ตำแหน่ง *CYP2C9*2* ทดสอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 1 (จีโนไทป์แบบ C/T) และ 2 (จีโนไทป์แบบ C/C) ทดสอบอุณหภูมิขั้น annealing ที่ 59 61 63 65 และ 67 องศาเซลเซียส พบว่าไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 154 คู่เบส ทุกอุณหภูมิของทั้งสองตัวอย่าง แต่ที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส ปรากฏเป็นแถบจาง (ภาพที่ 2 ก) สรุปว่าอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้น annealing ส่วนไพรเมอร์คู่กลายพันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 230 คู่เบส ทุกอุณหภูมิของตัวอย่างที่ 1 แต่ปรากฏเป็นแถบจาง ที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส แต่ตัวอย่างที่ 2 ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 230 คู่เบส ทุกอุณหภูมิ และยังพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ ที่อุณหภูมิ 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ทั้งสองตัวอย่าง (ภาพที่ 2 ข) จึงสรุปว่าอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิขั้น annealing ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 230 คู่เบส ชัดเจนและพบแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะจำนวนน้อยและจาง และไพรเมอร์คู่สุดท้าย คือ ไพรเมอร์คู่ควบคุม ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 346 คู่เบส และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะทุกอุณหภูมิ ทั้งสองตัวอย่าง (ภาพที่ 2 ค) สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิขั้น annealing ทุกอุณหภูมิที่ทดสอบเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้ ส่วนที่สปีส์ตำแหน่ง *CYP2C9*3* จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์ และควบคุม ทดสอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 1 (จีโนไทป์แบบ A/A) และ 2 (จีโนไทป์แบบ A/A) กำหนดความแตกต่างของอุณหภูมิขั้น annealing ดังนี้ 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 128 คู่เบส ทุกอุณหภูมิทั้งสองตัวอย่าง (ภาพที่ 3 ก) สรุปว่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้น annealing คือ 65 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีขนาดของแถบดีเอ็นเอขนาด 128 คู่เบสที่จำเพาะ และไม่พบแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะ ส่วนไพรเมอร์คู่ควบคุมให้แถบดีเอ็นเอขนาด 289 คู่เบส และไม่พบแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะทุกอุณหภูมิทั้งสองตัวอย่าง (ภาพที่ 3 ข) ดังนั้นอุณหภูมิขั้น annealing ทุกอุณหภูมิที่

ทดสอบเหมาะสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้ และไพรเมอร์คู่สุดท้ายคือไพรเมอร์คู่กลายพันธุ์ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังขนาด 200 คู่เบส ทดสอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 1 (จีโนไทป์แบบ A/A) และ 2 (จีโนไทป์แบบ A/A) ไม่พบแถบดีเอ็นเอทุกอุณหภูมิทั้งสองตัวอย่างรวมทั้งตัวอย่างควบคุมแบบลบ (no template DNA, NTC) (ภาพที่ 3 ค) จึงทดสอบเพิ่มด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 1 (จีโนไทป์แบบ A/A) และ 3 (จีโนไทป์แบบ A/C) ใช้อุณหภูมิขั้น annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส (อ้างอิงอุณหภูมิที่ดีที่สุดจากไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์) โดยเปรียบเทียบกับไพรเมอร์คู่ควบคุมและไวลด์ไทป์จากการทดสอบปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 128 (wild type) และ 289 (control) คู่เบส ทั้งสองตัวอย่าง แต่ตัวอย่างหมายเลข 3 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 200 (mutant) คู่เบส ในขณะที่ตัวอย่างหมายเลข 1 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 3 ง) สรุปว่าอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิขั้น annealing ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้

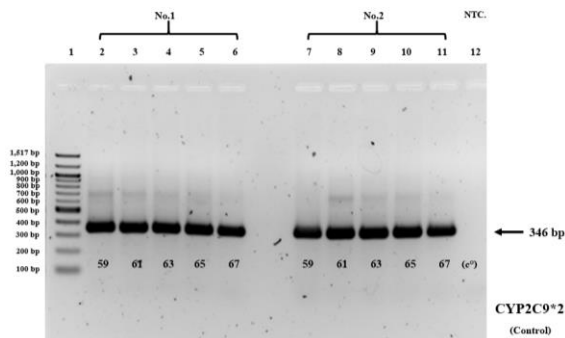
การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน มีหลายเทคนิค เช่น real-time PCR PCR-RFLP และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความซับซ้อน ใช้เวลานานและราคาค่าตรวจสูง (Tyagi *et al.*, 2018) เทคนิค allele-specific PCR เป็นเทคนิคที่สามารถระบุจีโนไทป์ที่มีตำแหน่งสปีส์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความสะดวก ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง ง่ายต่อการแปลผล และราคาค่าตรวจถูกกว่าวิธีข้างต้น (Wangkumhang *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2018) จากการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *CYP2C9* ที่สปีส์ตำแหน่ง *CYP2C9*2* ไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์และควบคุม ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะ แต่ไพรเมอร์คู่กลายพันธุ์มีแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะเกิดขึ้น อาจเนื่องจากมีความเข้มข้นของสารละลาย $MgCl_2$ มากเกินไป เป็นผลให้ไพรเมอร์สามารถจับกับสายดีเอ็นเอเป็นแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะได้ (Park and Kohel, 1994) ส่วนสปีส์ตำแหน่ง *CYP2C9*3* พบเพียงแถบดีเอ็นเอจำเพาะ แต่การทดสอบไพรเมอร์คู่กลายพันธุ์ ไม่ได้กำหนดความแตกต่างของอุณหภูมิขั้น annealing ซึ่งแตกต่างจากการทดสอบไพรเมอร์คู่อื่น เนื่องจากประชากรที่มีลักษณะการกลายพันธุ์ของสปีส์ตำแหน่ง *CYP2C9*3* ดังตัวอย่างหมายเลข 3 มีดีเอ็นเอปริมาณน้อยมาก ทำให้ตัวอย่างไม่เพียงพอต่อการทดสอบที่สถานะอุณหภูมิอื่น ดังนั้นอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาขั้น annealing ที่เหมาะสมที่สุด คือ 65 องศาเซลเซียส ของทุกคู่ไพรเมอร์ เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะหรือพบได้น้อยมาก



(ก)

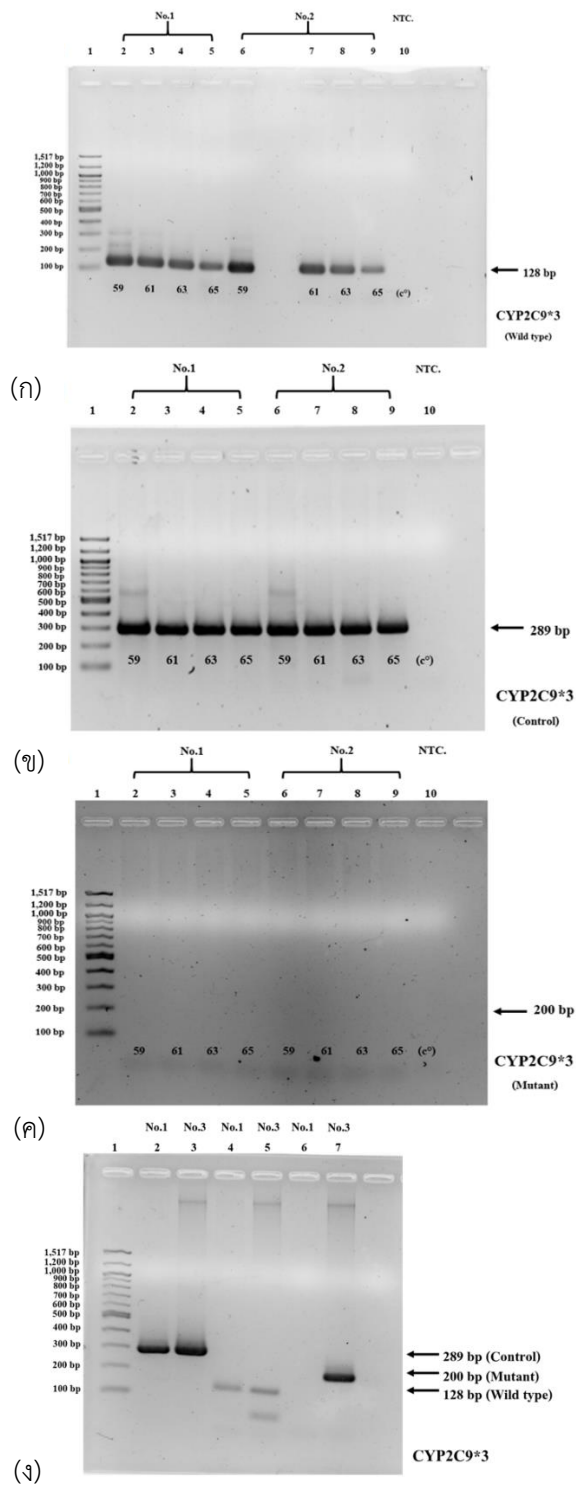


(ข)



(ค)

ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CYP2C9* ที่สลับตำแหน่ง *CYP2C9*2* (c.430 C>T) (ก) ใช้ไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์ ขนาด 154 คู่เบส (ข) ใช้ไพรเมอร์คู่กลายพันธุ์ ขนาด 230 คู่เบส (ค) ใช้ไพรเมอร์คู่ควบคุม ขนาด 346 คู่เบส ซึ่งแถวที่ 1 แทน DNA ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2-6 ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 1 (จีโนไทป์แบบ C/T) โดยอุณหภูมิขั้นตอน annealing ได้แก่ 59 61 63 65 และ 67 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถวที่ 7-11 ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 2 (จีโนไทป์แบบ C/C) โดยอุณหภูมิขั้นตอน annealing ได้แก่ 59 61 63 65 และ 67 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และแถวสุดท้ายคือ แถวที่ 12 กลุ่มควบคุมแบบลบ (no template DNA, NTC)



ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CYP2C9* ที่สลับตำแหน่ง *CYP2C9*3* (c.1075A>C) (ก) ใช้ไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์ ขนาด 128 คู่เบส (ข) ใช้ไพรเมอร์คู่ควบคุม

ขนาด 289 คู่เบส (ค) ใช้ไพรเมอร์คู่กลายพันธุ์ขนาด 200 คู่เบส ซึ่งแถวที่ 1 DNA ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2-5 ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 1 (จีโนไทป์แบบ A/A) โดยอุณหภูมิขั้นตอน annealing ได้แก่ 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถวที่ 6-9 ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 2 (จีโนไทป์แบบ A/A) โดยอุณหภูมิขั้นตอน annealing ได้แก่ 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และแถวที่ 12 กลุ่มควบคุมแบบลบ (no template DNA) (ง) ใช้ไพรเมอร์คู่กลายพันธุ์ ขนาด 200 คู่เบส เปรียบเทียบกับไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์ และควบคุม ที่อุณหภูมิขั้นตอน annealing 65 องศาเซลเซียส โดยแถวที่ 1 DNA ladder 100 คู่เบส แถวที่ 2 4 และ 6 คือดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 1 ไพรเมอร์คู่ควบคุม ไวลด์ไทป์ และกลายพันธุ์ ตามลำดับ แถวที่ 3 5 และ 7 ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ 3 (จีโนไทป์แบบ A/C) ไพรเมอร์คู่ควบคุม ไวลด์ไทป์ และกลายพันธุ์ ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

จากการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *CYP2C9* ที่สปีส์ตำแหน่ง *CYP2C9*2* และ *CYP2C9*3* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ทุกคู่ไพรเมอร์ของสปีส์ทั้งสองตำแหน่ง คืออุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอน annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรส ที่สภาวะ 100 โวลต์ ใช้เวลา 50 นาที และผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบสปีส์ทั้งสองตำแหน่งที่ยืนยันผลด้วยวิธี Sanger DNA sequencing โดยการทำ nucleotide blast กับ NCBI reference sequence: NG_008385.2 พบว่ามีความสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYP2C9* ในฐานข้อมูล NCBI 100 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดในการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น เนื่องจากข้อจำกัดของจำนวนตัวอย่างที่ดีเอ็นเอทราบจีโนไทป์แล้ว ซึ่งยังไม่ครอบคลุมจีโนไทป์ที่เป็นไปได้ทั้งหมดของสปีส์ทั้งสองตำแหน่ง โดยเฉพาะตัวอย่าง homozygous mutation ของสปีส์ *CYP2C9*2* และ *CYP2C9*3* ซึ่งเป็นจีโนไทป์ที่พบได้น้อยมากในประชากรไทย โดยขณะนี้ทางคณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการอื่น ๆ

การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษานำร่องเพื่อพัฒนาวิธี AS-PCR สำหรับใช้สำหรับตรวจหาจีโนไทป์ของยีน *CYP2C9* ดังนั้นผลสรุปสภาวะพีซีอาร์ที่ได้ในครั้งนี้ พบว่ายังมีผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะปรากฏอยู่ คณะผู้วิจัยจึงมีแผนการพัฒนางานต่อไป โดยจะมีการปรับจากการทำ singleplex AS-PCR ซึ่งต้องแยกหลอดสำหรับไพรเมอร์แต่ละคู่ เปลี่ยนเป็น multiplex AS-PCR ของสปีส์ทั้งสองตำแหน่ง ซึ่งจะช่วยให้สามารถทำได้สะดวก รวดเร็วขึ้น และมีต้นทุนลดลง เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล โดยในการพัฒนาเป็น multiplex AS-PCR นั้นอาจจะมีการปรับอุณหภูมิสำหรับพีซีอาร์ขั้นตอน annealing ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ รวมทั้งสัดส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์อีกครั้ง เพื่อปรับลดผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะและให้ได้สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสมมากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นพ.สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา อนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอ และหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์และสถานที่

เอกสารอ้างอิง

- ชลภัทร สุขเกษม. (2554). การประยุกต์ใช้ตัวบ่งชี้ทางเภสัชพันธุศาสตร์เพื่อการปรับขนาดยาในเวชปฏิบัติ. *จุฬาลงกรณ์เวชสาร*, 55(1), 39-53.
- นิത്യสุภา วัฒนชัย และสุทธิดา แก้วมุงคุณ. (2560). เภสัชวิทยาและปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของยารวาร์ฟาริน. *ศรีนครินทร์เวชสาร*, 32(2), 189-199.
- สมาคมแพทย์โรคหัวใจแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. (2553). *แนวทางการรักษาผู้ป่วยด้วยยาต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดรับประทาน*. สืบค้นเมื่อ 1 มกราคม 2563. จาก: http://www.thaiheart.org/images/column_1292154183/warfarin_Guideline%281%29.pdf.
- สุทธิดา แก้วมุงคุณ นิത്യสุภา วัฒนชัย และวิจิตรา ทศนิยมกุล. (2559). ปัจจัยทางคลินิกและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการรักษาด้วยยารวาร์ฟารินในขนาดคงที่. ใน *การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษา ระดับชาติและนานาชาติ*. ขอนแก่น.
- Goldhaber, S.Z., Weitz, J.I. and Piazza, G. (2013). Pulmonary embolism. in creager, M.A., Beckman, J.A., Loscalzo J. (Eds.), *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, pp. 627-638. Boston: Saunders Elsevier.
- Maneechay, W., Chittithavorn, V., Lertlam, L., Sirisathienrooch, T., Duangpakdee, P. and Sangkhathat, S. (2017). Genotype distributions of *CYP2C9* and *VKORC1* in southern Thais and their association with warfarin maintenance dose in patients with cardiac surgery. *Asian Biomedicine*, 11(1), 81-87.
- Wangkumhang, P., Chaichoompu, K., Ngamphiw, C., Ruangrit, U., Chanprasert, J., Assawamakin, A. and Tongsim, S. (2007). WASP: a web-based allele-specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics*, 8(275), doi:10.1186/1471-2164/8/275.
- Wattanachai, N., Kaewmoongkun, S., Pussadhamma, B. Makarawate, P., Wongvipaporn, C., Kiatchoosakun, S., Vannaprasaht, S. and Tassaneeyakul, W. (2017). The impact of non-genetic and genetic factors on a stable warfarin dose in Thai patients. *The European Journal of Clinical Pharmacology*, 73, 973-980
- Park, Y.H. and Kohel, R.J. (1994). Effect of concentration of $MgCl_2$ on random-amplified DNA polymorphism. *Biotechniques*, 16(4), 652-656.

- Tyagi, A.K., Khoshbeen, M.B., Curtis, P.H., Uppugunduri, C.R.S. and Ansar, M. (2018). Development and validation of an allele-specific PCR assay for genotyping a promoter and exonic single nucleotide polymorphisms of *MGMT* gene. *Journal of Biological Methods*, 5(2), doi: 10.14440/jbm.2018.224.