

การตรวจคัดกรอง hotspot mutation ในจีน *ATP7B* เพื่อการวินิจฉัยโรควิลสัน ในประชากรไทยด้วยวิธี PCR-RFLP

เสริมศิริ จิตต์ผูก¹ บุญยวิษณุ คุณากร² วาสนา สถิตย์จันทร์สกุล¹ มานิสภา บุษบารัตน์³
อัจฉรา ธัญธีรธรรม³ ดลนิกัทร เดชสุพงษ์⁴

¹สำนักงานวิจัย วิชาการและนวัตกรรม คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

²หลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

³หน่วยเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

⁴กลุ่มสาขาวิชาเวชศาสตร์ปริวรรต คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

Received: August 26, 2019

Revised: February 14, 2020

Accepted: March 24, 2020

บทคัดย่อ

โรควิลสัน (Wilson disease) เป็นโรคพันธุกรรมที่มีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ถ่ายทอดแบบ autosomal recessive จีน *ATP7B* เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของทองแดงภายในร่างกาย การกลายพันธุ์ส่งผลให้เกิดการสะสมของทองแดงในอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะใน ตับ สมอง เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเกิดภาวะตับอักเสบ ตับแข็ง และความผิดปกติทางระบบประสาท ปัจจุบันสามารถตรวจวินิจฉัยโรควิลสันทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ผิดปกติทั้งหมดของจีน *ATP7B* ในผู้ป่วย แต่การตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง จากฐานข้อมูลการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* พบตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรควิลสันในทวีปเอเชียบน exon 8, 12, 13 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองตำแหน่งการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ที่พบบ่อย (hotspot mutation) คือ c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้น และค้นหาผู้ที่มีจีโนพาหะของโรค (Carrier) โดยทำการศึกษาในตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยโรควิลสันที่ได้รับการวินิจฉัยและยืนยันตำแหน่งการกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 1 ราย และตัวอย่างดีเอ็นเอจากประชากรไทย จำนวน 90 ราย โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของจีน *ATP7B* แต่ละตำแหน่งด้วยวิธีพีซีอาร์ และตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี จากการศึกษาพบว่าเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี สามารถจำแนกการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ในแต่ละตำแหน่งระหว่างผู้ป่วยที่เป็นพาหะและคนปกติได้ จากผลการศึกษา ไพร์เมอร์ และเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีที่เลือกใช้ สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นก่อนการส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่า เพื่อใช้ในการวางแผนการมีบุตร และสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยเพื่อหาอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ในประชากรไทยได้

คำสำคัญ: โรควิลสัน การกลายพันธุ์ จีน *ATP7B* พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:

ดลนิกัทร เดชสุพงษ์

กลุ่มสาขาวิชาเวชศาสตร์ปริวรรต คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

270 ถ.พระราม 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

อีเมล: donniphath.dej@mahidol.ac.th

Hotspot mutation screening in *ATP7B* Wilson disease in Thai population by PCR-RFLP

Sersiri Chitphuk¹, Boonyawish Kunakorn², Wasana Stitchantrakul¹, Manisa Boosabararana³,
Atchara Tunteeratum³, Donniphat Dejsuphong⁴

¹Office of Academic Affairs, Research, and Innovation, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University

²Doctor of Medicine Program, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University

³Division of Medical Genetics, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University

⁴Section for Translational Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University

Abstract

Wilson disease is inherited in an autosomal recessive pattern. Mutation in *ATP7B* gene leads to defect in metabolism and deposition of copper in Wilson disease patients. Accumulation of copper in liver, brain and various internal organs contributes to hepatitis, liver cirrhosis and neurological defects. *ATP7B* is the single causative gene and spans 21 exons. Molecular testing of carrier and patients suspected of Wilson disease requires whole gene DNA sequencing which is cost ineffective and time consuming in Thailand. Mutation database has shown that hotspots of *ATP7B* mutation in exon 8, 12, 13 are the most prevalent in Asian population. We have developed PCR-RFLP technique for screening of Asian hotspot mutations of *ATP7B* gene in positions c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) and c.3443 C>T (p.Ile1148Thr). In this study, DNA previously extracted from 4 patients with known *ATP7B* mutation in hotspots of *ATP7B* gene and 90 DNA samples from Thai population were tested. DNA samples were amplified by PCR technique then cut with specific restriction enzyme and analyzed by PCR-RFLP technique. The result showed that PCR-RFLP technique can classify point mutations of *ATP7B* gene in positions c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) and c.3443 C>T between Wilson's patients carrier and non-carrier Thai adult. This screening method successfully detect mutations in Wilson disease patients and could be used as a screening test in carriers and patients in Thai population with reduced clinical cost and turnaround time in Thailand.

Keywords: Wilson disease, mutation, *ATP7B*, PCR-RFLP

Corresponding Author:

Donniphat Dejsuphong

Section for Translational Medicine, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University
270 Rama VI Road, Ratchatewi, Bangkok 10400, Thailand
E-mail: donniphat.dej@mahidol.ac.th

บทนำ

โรควิลสัน (Wilson disease) เป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive โดยเกิดจากความผิดปกติของยีน *ATP7B* บนโครโมโซมคู่ที่ 13 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน copper-transporting ATPase 2 ที่ทำหน้าที่ขนส่งทองแดงเข้าและออกจากเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ตับ เมื่อโปรตีนผิดปกติส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดทองแดงส่วนเกินออกไปได้ จึงเกิดการสะสมของทองแดง หรือ ภาวะคั่งทองแดง ในอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ สมอง และเนื้อเยื่อต่างๆ เป็นต้น ผู้ป่วยโรควิลสัน จะมีลักษณะอาการแสดงเฉพาะ คือ จะพบวงแหวนสีน้ำตาลที่กระจกตา หรือที่เรียกว่า Kayser-Fleischer ring และพบว่ามียาพิษสภาพที่ผิดปกติของตับ เช่น ตับอักเสบ ตับแข็ง หรือ ตีฆาน เป็นต้น อีกทั้งยังพบความผิดปกติเกี่ยวกับการพูดและการเคลื่อนไหวของร่างกายอีกด้วย¹

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า จะพบผู้ป่วยโรควิลสัน 1 คน ในประชากร 30,000 คน โดยเฉลี่ยจากประชากรทั่วโลก และมีอุบัติการณ์รายงานว่า ประชากรทั่วไปมีเงินที่เป็นพาหะของโรค (Carrier) 1 คน ในประชากร 90 คน และสามารถพบผู้ป่วยและผู้ที่มีเงินพาหะในหลากหลายเชื้อชาติ^{2,3} จากการศึกษาของ Coffey et al. 2013 โดยศึกษาในกลุ่มประชากรในประเทศอังกฤษ พบว่ามีอุบัติการณ์การเกิดโรควิลสัน สูงถึง 1 ใน 7,029 คน⁴ นอกจากนี้ จากการศึกษาในกลุ่มประชากรแถบภูมิภาคเอเชีย เช่น ประเทศเกาหลี และฮ่องกง พบว่ามีอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงขึ้นไปถึง 1 ใน 3,000 คน⁵ และ 1 ใน 5,400 คน⁶ ตามลำดับ จากการทบทวนงานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่พบการศึกษาอุบัติการณ์การเกิดโรคในประเทศไทย

ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบการกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ในตำแหน่ง c.2333 G>T (p.Arg 778Leu, amino acid ตำแหน่งที่ 778 เปลี่ยนจาก Arginine เป็น Leucine) ถึง 44-50% ของผู้ป่วยโรควิลสัน⁷⁻⁹ และจากการศึกษาของ Chloe M.

และ Ching L. ในปี 2008¹⁰ ได้รวบรวมข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ที่มีกพบบ่อยของประชากรในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยนำเสนอว่าการตรวจคัดกรอง Exon 8, 12, 13, 16 และ 18 ของยีน *ATP7B* ในประชากรในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สามารถครอบคลุมรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนของประชากรในแถบภูมิภาคนี้ได้ถึง 70% จากการศึกษาเกี่ยวกับโรควิลสันที่ผ่านมาในประเทศไทย การกลายพันธุ์แบบ p. Arg778Leu เป็นการกลายพันธุ์ที่สามารถพบได้บ่อยในคนไทย^{11,12} นอกจากนี้ ยังมีรายงานตำแหน่งการกลายพันธุ์อื่นๆ ในผู้ป่วยชาวไทยที่คล้ายคลึงกับการศึกษาในหลายประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น p.Arg778Leu (Exon 8), p.Arg919Gly (Exon 12), p.Pro992Leu (Exon 13) และ p.Ile1148Thr (Exon 16) เป็นต้น^{2,11,13,14}

โรควิลสันเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยและพบได้ในคนทุกเชื้อชาติ เมื่อเป็นโรคไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และจะมีอาการแสดงที่รุนแรงขึ้น อีกทั้งยังมีภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงในระยะยาว การตรวจเพื่อค้นหาเงินพาหะของโรคในสมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยโรควิลสันเพื่อใช้ในการวางแผนครอบครัว จึงเป็นประโยชน์ในการป้องกันมิให้มีผู้ป่วยเป็นโรควิลสันเพิ่มขึ้น ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีน *ATP7B* ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสในทุก exon ของยีน โดยวิธี DNA sequencing ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์สูงและใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน และทำได้ในห้องปฏิบัติการเพียงไม่กี่แห่งในประเทศไทย

วัตถุประสงค์

เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือ พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) และเทคนิคการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism) ในการตรวจวิเคราะห์

คัดกรองความผิดปกติของจีน *ATP7B* ในตำแหน่งที่มักพบบ่อย (Hotspot mutation) 4 ตำแหน่ง คือ c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr)

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างดีเอ็นเอ

ตัวอย่างดีเอ็นเอในการศึกษานี้มาจากผู้ป่วยโรควิลสัน ที่ได้รับการวินิจฉัยจากอายุรแพทย์ สาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่มีตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีน *ATP7B* คือ c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) ตำแหน่งละ 1 ราย และ ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้เข้าร่วมโครงการสำรวจสุขภาพพนักงานการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (EGAT study) จำนวน 90 ราย ตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดในการศึกษานี้เป็นสิ่งที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัย โดยผู้ป่วยและผู้เข้าร่วมโครงการได้ลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ และได้รับการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

ตัวอย่างดีเอ็นเอได้รับการสกัดสารพันธุกรรมโดยวิธี Phenol-Chloroform โดยมีขั้นตอนอธิบายโดยสังเขป ดังนี้ ล้างเม็ดเลือดแดงออกด้วยสารละลาย Lysis buffer (สารละลายประกอบด้วย 100mM Tris HCl, 0.32 M Sucrose และ 0.01% Triton X-100) จากนั้นเติมสารละลาย Sodium chloride-Tris-EDTA (STE) buffer, 10% SDS และ 5% Proteinase K เพื่อทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาว บ่มที่อุณหภูมิ 56°C ซ้ำมคิน จากนั้นสกัดโปรตีนออกด้วยสารละลาย Phenol-Chloroform และปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm ระยะเวลา 10 นาที เพื่อแยกชั้นสารละลายเก็บสารละลายใสส่วนบนและตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย

สารละลาย absolute ethanol จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยสารละลาย TE buffer และวัดปริมาณของตะกอนดีเอ็นเอโดยเครื่อง Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 nm เตรียมสารละลายดีเอ็นเอ ให้มีความเข้มข้น 50-100 ng/ μ l เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

2. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *ATP7B* แต่ละ exon ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเครื่อง Eppendorf Mastercycler Thermal cyler (Eppendorf, Germany) โดยใช้ Forward primer และ Reverse primer 4 คู่ (1 คู่/1 exon/1 ปฏิกริยา) ซึ่งแต่ละคู่ไพรเมอร์ครอบคลุม exon 8, 12, 13 และ 16 ของยีน *ATP7B* ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ในแต่ละปฏิกริยาพีซีอาร์ มีปริมาตร 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย 10X ViBuffer S (Vivantis, Malaysia) 2.5 μ l, 10 mM dNTPs mix (NEB, USA) 2 μ l, 20 mM Forward และ Reverse Primer อย่างละ 0.25 μ l, Taq DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) 0.2 μ l, Sterile water 14.8 μ l และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 5 μ l ทั้งนี้ การทำปฏิกริยาพีซีอาร์ของแต่ละ exon ใช้อุณหภูมิและเวลาในการเกิดปฏิกริยาเดียวกัน ปฏิกริยาพีซีอาร์จะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยเริ่มต้นจาก อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเปลี่ยนแปลงเป็นรอบๆ ดังนี้ Denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing ที่ 58.3°C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที โดยจะเกิดปฏิกริยาซ้ำทั้งหมด 30 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยใช้วิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) เทียบกับ 100 bp DNA ladder (NEB, USA) โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5% (w/v) และใช้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้น

นำเจลไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3. การเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) และการตรวจสอบชิ้นส่วน ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

การเลือกตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ ใช้โปรแกรม BioEdit version 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, USA) โดยเลือกเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะบริเวณที่มีการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ที่ตำแหน่ง c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 การตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี อาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ที่จะทำปฏิกิริยากับลำดับของนิวคลีโอไทด์

บนสายดีเอ็นเอ โดยจะตัดตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงเท่านั้น ทำให้ดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลง หากบนสายดีเอ็นเอไม่มีตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์ ก็จะไม่เกิดปฏิกิริยาการตัด โดยปฏิกิริยาอาร์เอฟแอลพี ประกอบไปด้วย 10X Cut smart buffer 1 µl, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 0.2 µl, ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5 µl และปรับปริมาตรด้วย Sterile water ให้ได้ปริมาตรรวม 10 µl จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน และตรวจสอบชิ้นส่วนของ DNA เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder (NEB, USA) ด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5% (w/v) ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ATP7B gene primers		Primer sequence	Product size (bp)
Exon 8	Forward Primer (<i>ATP7B</i> Ex8F)	5'-AAGCTAGAGGCTTTGCCATC-3'	403
	Reverse Primer (<i>ATP7B</i> Ex8R)	5'-TTGGTGTTTCAGAGGAAGTGAG-3'	
Exon 12	Forward Primer (<i>ATP7B</i> Ex12F)	5'-GAAGAGTTCTGGGAAATCAG-3'	467
	Reverse Primer (<i>ATP7B</i> Ex12R)	5'-AGGAGGTGACTGTTTATCC-3'	
Exon 13	Forward Primer (<i>ATP7B</i> Ex13F)	5'-CTCTCCTTCTGATGTGGAGAGC-3'	485
	Reverse Primer (<i>ATP7B</i> Ex13R)	5'-TCTCAGGCTTTTCTCTCAATGTG-3'	
Exon 16	Forward Primer (<i>ATP7B</i> Ex16F)	5'-GTTACAGTGAAATTGGACC-3'	418
	Reverse Primer (<i>ATP7B</i> Ex16R)	5'-GATGTACACAAAAGCCAGTGGAA-3'	

ตารางที่ 2 เอนไซม์ตัดจำเพาะและชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

Point Mutation	Product size before digestion (bp)	Restriction Enzyme	Restriction site	Restriction Product Size (bp)		
				Wild type allele	Homozygous mutant allele	Heterozygous mutant allele
p.Arg778Leu	403	MspI	C/CGG	-	403	403
				309	-	309
				94	-	94
p.Arg919Gly	467	MspI	C/CGG	-	467	467
				287	-	287
				180	-	180
p.Pro992Leu	485	BtgI	C/CACGG	-	485	485
				258	-	258
				227	-	227
p.Ile1148Thr	418	DdeI	C/TGAG	418	-	418
				-	247	247
				-	171	171

ผลการศึกษา

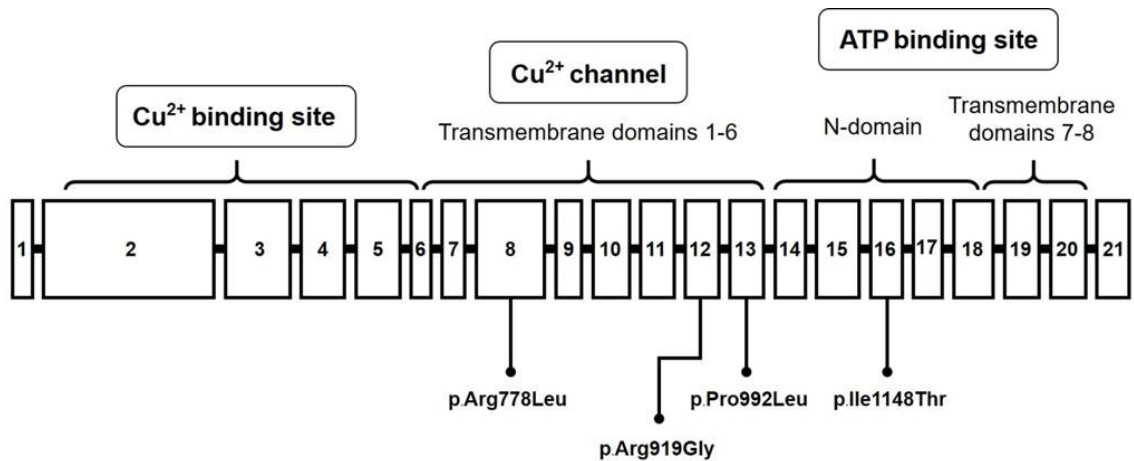
งานวิจัยในครั้งนี้ทำการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ที่ตำแหน่ง c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบได้บ่อยจากฐานข้อมูลผู้ป่วยโรควิลสันในเอเชียและคาดว่าจะพบได้บ่อยในประเทศไทย แผนภาพของยีน *ATP7B* และตำแหน่งที่ทำการศึกษาแสดงในรูปที่ 1 การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี มาใช้ในการแยกความแตกต่างของจีโนไทป์ของยีนในแต่ละตำแหน่ง ดังนี้ การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ตำแหน่ง p.Arg778Leu (Exon 8) และ p.Arg919Gly (Exon 12) ใช้เอนไซม์ MspI ในการทำปฏิกิริยา เอนไซม์จะตัดบริเวณลำดับเบส C/CGG ซึ่งเป็นลำดับเบสของคนปกติ (WT) ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกัน คือ 94, 309 bp (Exon 8) และ 180, 287 bp (Exon 12) ตามลำดับ แต่ในผู้ป่วย

โรควิลสันที่มีการกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ตำแหน่งของยีน *ATP7B* ตำแหน่ง p.Arg778Leu (Exon 8) และ p.Arg919Gly (Exon 12) เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยาการตัด จะเห็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 403 bp และ 467 bp ดังแสดงในรูปที่ 2A การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ตำแหน่ง p.Pro992Leu (Exon 13) จะใช้เอนไซม์ BtgI ในการทำปฏิกิริยาการตัดที่ลำดับเบส C/CACGG ซึ่งเป็นลำดับเบสในคนปกติ (WT) โดยจะเกิดปฏิกิริยาการตัดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 227, 258 bp แต่ในผู้ป่วยโรควิลสันที่มีการกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ตำแหน่งดังกล่าว เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยาการตัด จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 485 bp ดังแสดงในรูปที่ 2B การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ตำแหน่ง p.Ile1148Thr (Exon 16) ใช้เอนไซม์ DdeI ในการตัดที่ลำดับเบส C/TGAG ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาในผู้ป่วยโรควิลสันที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ตำแหน่ง p.Ile1148Thr (ATT>ACT)

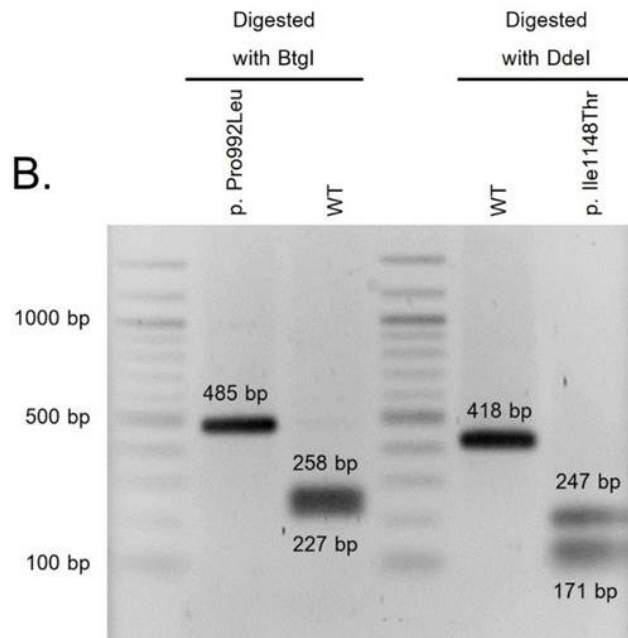
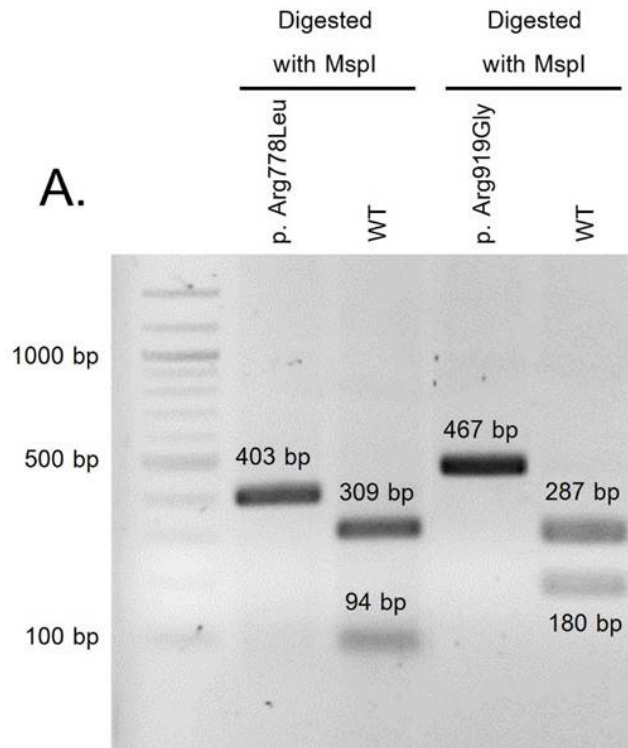
เท่านั้น จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 171, 247 bp และจะไม่เกิดปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอในคนปกติ (WT) จึงได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 418 bp ดังแสดงในรูปที่ 2B

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ทั้ง 4 ตำแหน่ง คือ c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) ในกลุ่มตัวอย่างประชากรไทยจำนวน 90 ราย การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ที่ตำแหน่ง c.2333 G>T (p.Arg778Leu) พบลักษณะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ในเลนที่ 10 ขนาด 94, 309 และ 403 bp ตามลำดับ ดังรูปที่ 3 จำนวน 1 ราย และการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ที่ตำแหน่ง c.2755

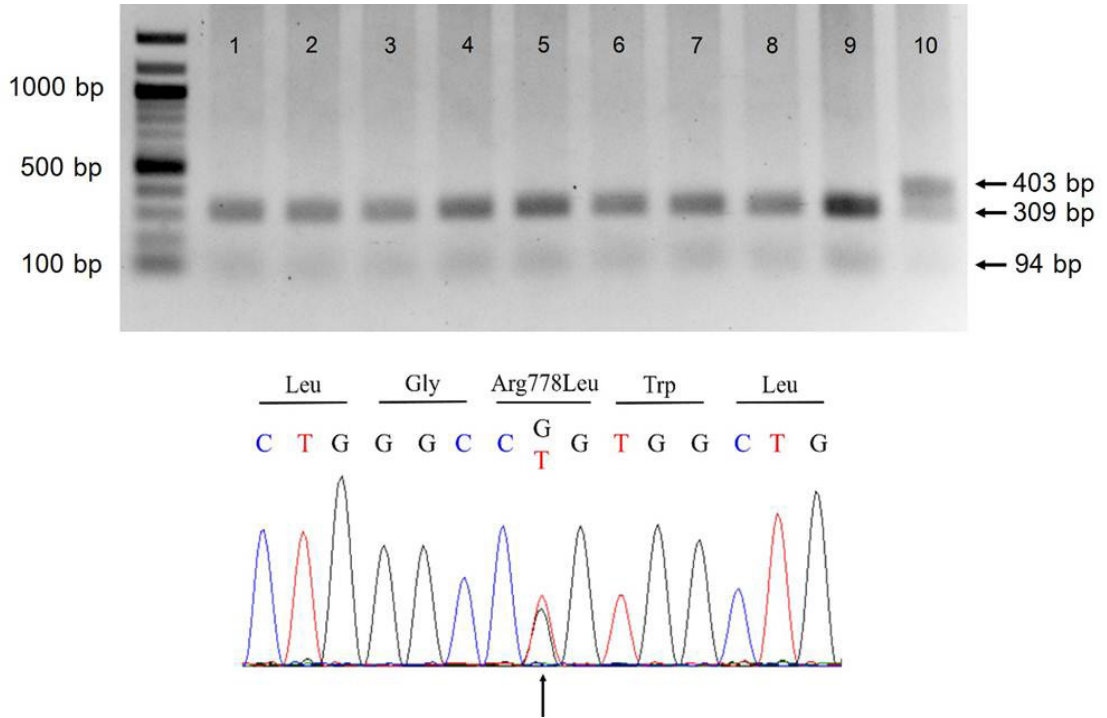
C>G (p.Arg919Gly) พบลักษณะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ในเลนที่ 8 ขนาด 180, 287 และ 467 bp ตามลำดับ ดังรูปที่ 4 จำนวน 1 ราย จึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอของทั้ง 2 ราย ตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี DNA Sequencing อีกครั้งพบว่า ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอให้ผลจีโนไทป์ที่มีลักษณะแบบ Heterozygous คือ มีการกลายพันธุ์ของลำดับเบสบนยีนเพียง 1 อัลลีล โดยแสดงเป็นกราฟโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *ATP7B* ที่ตำแหน่ง c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 90 ราย ไม่พบการกลายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี



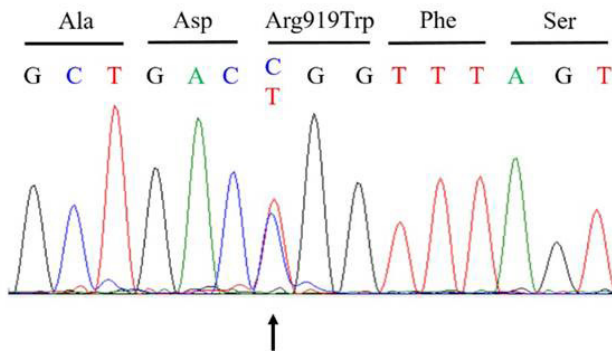
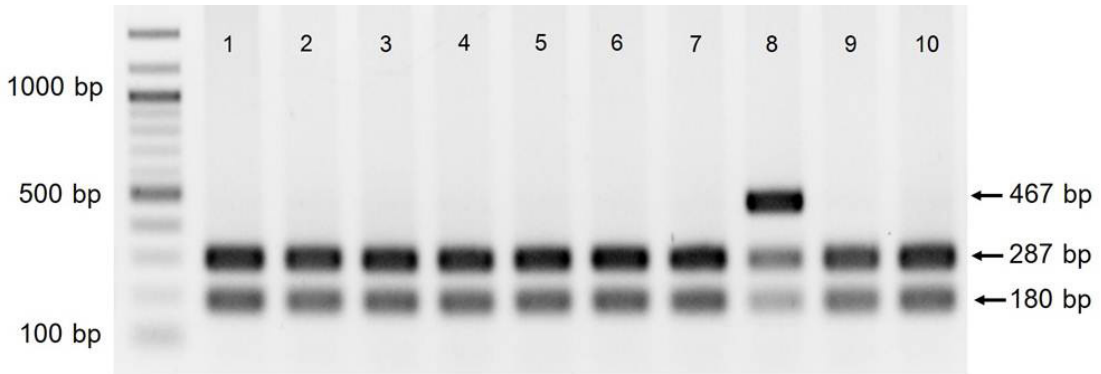
รูปที่ 1 แผนภาพตำแหน่ง hotspot mutation บน Exon ของ *ATP7B* gene¹⁵



รูปที่ 2 รูปแบบจีโนไทป์ของตำแหน่ง hotspot mutation ภายหลังจากเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี;
 A. รูปแบบจีโนไทป์ของตำแหน่ง p.Arg778Leu และ p.Arg919Gly เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ปกติ (WT)
 B. รูปแบบจีโนไทป์ของตำแหน่ง p.Pro992Leu และ p.Ile1148Thr เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ปกติ (WT)



รูปที่ 3 การวิเคราะห์การกลายพันธุ์บนจีน *ATP7B* ที่ตำแหน่ง p.Arg778Leu ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี Lane ที่ 1-9 แสดงรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของคนปกติ (94 และ 309 bp); Lane ที่ 10 แสดงรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของคนที่เป็นพาหะของโรควิลสัน (Carrier) (94, 309 และ 403 bp); โครมาโตแกรมของตัวอย่างดีเอ็นเอในเลนที่ 10 ซึ่งวิเคราะห์ยืนยันโดยวิธี DNA sequencing แสดงรูปแบบจีโนไทป์แบบ Heterozygous



รูปที่ 4 การวิเคราะห์การกลายพันธุ์บนจีน *ATP7B* ที่ตำแหน่ง p.Arg919Trp ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี Lane ที่ 1-7, 9-10 แสดงรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของคนปกติ (180 และ 287 bp); Lane ที่ 8 แสดงรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของคนที่เป็นพาหะของโรคควิลสัน (Carrier) (180, 287 และ 467 bp); โครมาโตแกรมของตัวอย่างดีเอ็นเอในเลนที่ 8 ซึ่งวิเคราะห์ยืนยันโดยวิธี DNA sequencing แสดงรูปแบบจีโนไทป์แบบ Heterozygous

อภิปรายผล

การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี เป็นเทคนิคที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่มีราคาแพง สามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจคัดกรองตำแหน่ง hotspot mutation ของจีน *ATP7B* เพื่อวินิจฉัยโรคควิลสันได้ จากผลการศึกษานี้ การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีสามารถแยกความแตกต่างที่ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ทั้ง 4 ตำแหน่ง คือ c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr)

ในผู้ป่วยโรคควิลสันและคนปกติได้ โดยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จะตัดหรือไม่ตัดกับบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ และสามารถนำผลการวิเคราะห์ไปประกอบการตรวจวินิจฉัยโรคควิลสันของแพทย์ในขั้นตอนการตรวจรักษาต่อไป แต่เทคนิคดังกล่าวอาจมีข้อจำกัด เมื่อชิ้นส่วนของดีเอ็นเอภายหลังการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี มีขนาดแตกต่างกันน้อยกว่า 10 bp การแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) อาจแยกชิ้นส่วนออกจากกันได้ยาก แม้จะใช้ความเข้มข้นของเจลสูงขึ้น ดังนั้นการออกแบบตำแหน่งของการตัดของเอนไซม์

ตัดจำเพาะ จำเป็นต้องคำนึงถึงขนาดของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นภายหลังการเกิดปฏิกิริยาด้วย เมื่อตรวจพบการกลายพันธุ์จากเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ควรทำการตรวจวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันความถูกต้อง ด้วยการตรวจลำดับเบสโดยวิธี DNA Sequencing

นอกจากนี้ การสกัดสารพันธุกรรมมีความสำคัญอย่างยิ่งกับเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี หากมีการปนเปื้อนสารละลายต่างๆ ในขั้นตอนการสกัด อาทิ การปนเปื้อนสารละลาย Phenol-Chloroform เป็นต้น อาจทำให้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ หรือได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์น้อยลง ส่งผลให้การแปลผลปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเป็นไปได้ยาก

เนื่องจากจีน *ATP7B* เป็นยีนขนาดใหญ่ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนในการขนส่งทองแดงเข้าและออกจากเซลล์ ความรุนแรงของโรควิลสัน จึงขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของจีน¹⁶ การตรวจพบความผิดปกติของจีนเพียงจุดๆ เดียว อาจยังไม่เพียงพอที่จะระบุว่าเป็นโรควิลสัน จึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองหาความผิดปกติของลำดับเบสใน exon อื่นๆ ด้วย¹⁷ ตำแหน่งการกลายพันธุ์บนจีน *ATP7B* ทั้ง 4 ตำแหน่ง คือ c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) เป็นตำแหน่ง Hotspot mutation หรือตำแหน่งที่มีความถี่ในการกลายพันธุ์สูง ที่มีการศึกษาในกลุ่มประชากรแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออก¹⁰ ดังนั้น จึงควรนำเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองตำแหน่งการกลายพันธุ์บนจีน *ATP7B* ทั้ง 4 ตำแหน่ง ถึงแม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะไม่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) ซึ่งอาจเกิดจากข้อจำกัดของจำนวนกลุ่มตัวอย่าง

ที่น้อยเกินไป หากมีการศึกษาในจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้น อาจพบความผิดปกติที่ตำแหน่งดังกล่าวได้

ถึงแม้ว่าโรควิลสันจะเป็นโรคที่ถูกค้นพบได้น้อยเมื่อเทียบกับโรคอื่น แต่เนื่องจากความรุนแรงของโรคและการดำเนินของโรคสามารถตรวจพบได้หลายอวัยวะ อาทิ ตับ ระบบประสาท เป็นต้น การตรวจพบความผิดปกติสามารถพบได้ในช่วงอายุค่อนข้างกว้าง การตรวจคัดกรองโรคเบื้องต้นจึงเป็นสิ่งสำคัญ การนำเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากจะช่วยในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองโรควิลสันแล้ว ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาการหาตำแหน่ง Hotspot mutation ของจีน *ATP7B* ตำแหน่งอื่นๆ ในประชากรไทยได้อีกด้วย

สรุปผล

การนำเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อคัดกรองการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรควิลสัน โดยใช้ไพรเมอร์และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ทั้ง 4 ตำแหน่ง คือ c.2333 G>T (p.Arg778Leu), c.2755 C>G (p.Arg919Gly), c.2975 C>T (p.Pro992Leu) และ c.3443 C>T (p.Ile1148Thr) สามารถแยกความแตกต่างที่ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของจีน *ATP7B* ทั้ง 4 ตำแหน่งของผู้ป่วยโรควิลสันและคนปกติได้ อีกทั้งเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ยังช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์เหมาะสมสำหรับนำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองในการค้นหาผู้ที่มียีนที่เป็นพาหะของโรค เพื่อใช้ในการวางแผนการมีบุตร เป็นการป้องกันมิให้มีผู้ป่วยเป็นโรควิลสันเพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานวิจัย วิชาการและนวัตกรรม คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี และหน่วยเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี สำหรับความร่วมมือในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผลงานวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในคน คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล (ID-05-51-19 ว)

References

1. Rosencrantz R, Schilsky M. Wilson disease: pathogenesis and clinical considerations in diagnosis and treatment. *Semin Liver Dis* 2011;31(3):245-59.
2. Dong Y, Ni W, Chen WJ, et al. Spectrum and classification of ATP7B variants in a large cohort of Chinese patients with Wilson's disease guides genetic diagnosis. *Theranostics* 2016;6(5):638-49.
3. Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease. *Lancet* 2007;369(9559):397-408.
4. Coffey AJ, Durkie M, Hague S, et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain* 2013;136(Pt 5):1476-87.
5. Park HD, Ki CS, Lee SY, et al. Carrier frequency of the R778L, A874V, and N1270S mutations in the ATP7B gene in a Korean population. *Clin Genet* 2009;75(4):405-7.
6. Mak CM, Lam CW, Tam S, et al. Mutational analysis of 65 Wilson disease patients in Hong Kong Chinese: identification of 17 novel mutations and its genetic heterogeneity. *J Hum Genet* 2008;53(1): 55-63.
7. Yoo HW. Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human ATP7B gene of Korean patients with Wilson disease. *Genet Med* 2002;4(6 Suppl):43S-8S.
8. Liu XQ, Zhang YF, Liu TT, et al. Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World J Gastroenterol* 2004;10(4):590-3.
9. Wan L, Tsai CH, Tsai Y, et al. Mutation analysis of Taiwanese Wilson disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(2):734-8.
10. Mak CM, Lam CW. Diagnosis of Wilson's disease: a comprehensive review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008;45(3):263-90.
11. Panichareon B, Taweechue K, Thongnoppakhun W, et al. Six novel ATP7B mutations in Thai patients with Wilson disease. *Eur J Med Genet* 2011;54(2):103-7.
12. Keandaungjuntr J, Busabaratana M, Kositchaiwat C, et al. Analysis of exon 8 of ATP7B gene in Thai patients with Wilson disease. *J Med Assoc Thai* 2011;94(10):1184-8.

13. Wei Z, Huang Y, Liu A, et al. Mutational characterization of ATP7B gene in 103 Wilson's disease patients from Southern China: identification of three novel mutations. *Neuroreport* 2014;25(14): 1075-80.
14. Hua R, Hua F, Jiao Y, et al. Mutational analysis of ATP7B in Chinese Wilson disease patients. *Am J Transl Res* 2016; 8(6):2851-61.
15. Li XH, Lu Y, Ling Y, et al. Clinical and molecular characterization of Wilson's disease in China: identification of 14 novel mutations. *BMC Med Genet* 2011;12:6.
16. Huster D, Kuhne A, Bhattacharjee A, et al. Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants. *Gastroenterology* 2012;142(4):947-56.
17. Chen C, Shen B, Xiao JJ, et al. Currently clinical views on genetics of Wilson's disease. *Chin Med J* 2015;128(13):1826-30.