

## การตรวจคัดกรองตัวอ่อนด้วยเทคนิค CGH-PCR ใน เบต้า ธาลัสซีเมีย Embryonic beta-thalassemia screening with CGH-PCR technique

ธนรัตน์ ก. จันทราภานนท์\*, James Marshall, สาริณี ปิงสุทธีวงศ์, เกษร เตียวศิริ

Tanarut K. Jantapanon\*, James Marshall, Sarinee Pingsuthiwong, Kasorn Tiewsir

ศูนย์ซูพีเรีย เอ.อาร์.ที โอโอโกเนีย จำกัด กรุงเทพฯ 10400

Superior A.R.T., Bangkok 10400, Thailand

\*Corresponding author: sitkj1@gmail.com

### บทคัดย่อ

การตรวจความผิดปกติของตัวอ่อนมีวัตถุประสงค์คือ 1) เพื่อตรวจคัดกรองความผิดปกติของโครโมโซมทั้งจำนวนและโครงสร้าง (Preimplantation Genetic Screening, PGS) โดยเทคนิค Comparative Genomic Hybridization (CGH) และ 2) เพื่อการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD) โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ปัจจุบันการใช้เทคนิค CGH ร่วมกับ PCR (CGH-PCR) ทำให้สามารถตรวจคัดกรองความผิดปกติทั้งจำนวนโครโมโซม โครงสร้าง และยีนไปพร้อมกันได้ ต่างจากอดีตที่ตรวจคัดกรองได้เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบระหว่าง PCR และ CGH-PCR ในแง่ของความสมบูรณ์ของตัวอ่อนและอัตราการตั้งครรภ์ เพื่อการตรวจคัดกรองโรคเบต้าธาลัสซีเมีย พบว่าเมื่อใช้เทคนิค PCR เพื่อคัดกรองการกลายของยีนอย่างเดียวใน 23 ครอบครัว มีอัตราการตั้งครรภ์เพียง 53% ซึ่งอาจมีสาเหตุจากตัวอ่อนมีผิดปกติแต่อาจมีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมทำให้ตัวอ่อนไม่สามารถเจริญเติบโต ส่วนการใช้เทคนิค CGH ร่วมกับ PCR ในการคัดกรองโรคเบต้าธาลัสซีเมีย 8 ครอบครัว พบว่ามีอัตราการตั้งครรภ์และทารกมีความปกติ 100 % แสดงให้เห็นว่าเทคนิค CGH-PCR สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองตัวอ่อนและเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์

both in number and structure for Preimplantation Genetic Screening (PGS) by Comparative Genomic Hybridization (CGH) and 2) to diagnose gene mutation for Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) by Polymerase Chain Reaction (PCR). At present, combination of CGH with PCR techniques (CGH-PCR) enables genetic screening for mutations in the chromosome number, structure and gene level at the same time. This technique is an improvement from the testing in the past that can screen only on aspect at a time. This study compared between the PCR and CGH-PCR techniques for beta-thalassemia screening in the aspects of fetal maturity and pregnancy rate. The results showed that when the screening was analyzed based on the PCR technique along, the pregnancy rate was only 53% of 23 families. The reasons may be that the fetuses may have normal gene but had chromosomal abnormalities. When the CGH-PCR technique was employed for the screening, the pregnancy rate with healthy baby was 100% in 8 families. The results indicated that the CGH-PCR screening technique increased both the efficiency of embryonic beta thalassemia screening and the pregnancy rate.

### ABSTRACT

The objectives of preimplantation embryonic screening are 1) to detect chromosomal abnormalities,

คำสำคัญ: เบต้า ธาลัสซีเมีย; CGH-PCR; ตัวอ่อน

Keyword: Beta thalassemia; CGH-PCR; embryo

## บทนำ

ความเจริญก้าวหน้าทางพันธุศาสตร์มีมากขึ้น และถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์หลายอย่างที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในทางสูติศาสตร์คือการตรวจทางพันธุกรรมของตัวอ่อนก่อนการตั้งครรภ์ หรือ Preimplantation Genetic Testing ซึ่งมีการตรวจเพื่อการคัดกรอง (Preimplantation Genetic Screening, PGS) เช่นเทคนิค Comparative Genomic Hybridization (CGH) และการตรวจเพื่อการวินิจฉัย (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD) เช่นเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งมีวัตถุประสงค์ต่างกัน PGS คือการนำเซลล์ของตัวอ่อนมาใช้ในการคัดกรองความผิดปกติทางด้านจำนวนโครโมโซมของตัวอ่อน (aneuploidy) เพื่อหลีกเลี่ยงการย้ายตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ ส่วน PGD คือการนำเซลล์ของตัวอ่อนมาใช้ในการตรวจทางพันธุกรรม โดยจุดประสงค์เพื่อเลือกตัวอ่อนที่ไม่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมในคู่สมรสที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะของโรคทางพันธุกรรมใดๆ หรือเพื่อเลือกตัวอ่อนที่มีโครโมโซมที่ต้องการเพื่อจุดประสงค์เฉพาะ เช่น เพศ (โรค X-linked) หรือ แอนติเจนบนเม็ดเลือดขาว เป็นต้น

CGH คือการวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมทั้ง 24 แท่งโดยใช้หลักการเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์ที่ต้องการทดสอบ (test DNA) กับดีเอ็นเอควบคุม (control) โดยติดสีแยกกันระหว่างดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอทั้งสองส่วนไปจับกับ probe ซึ่งเป็นพันธุกรรมของมนุษย์ปกติจำนวนมหาศาลที่ติดอยู่กับแผ่นกระจก ปล่อยให้ดีเอ็นเอแข่งขันกันจับกับ probe ปกติ จากนั้นจึงนำแผ่นกระจกไปอ่านผลโดยใช้ scanner เพื่อนับจำนวนการจับของดีเอ็นเอทั้งสองส่วนโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ประมวลผล โดยปกติการจับของดีเอ็นเอทั้งสองส่วนกับ probe จะมีสัดส่วนเท่าๆ กัน แต่ในกรณีที่ test DNA จับได้มากกว่าดีเอ็นเอควบคุม แสดงว่ามีรหัสพันธุกรรมเกิน แต่ถ้าจับได้น้อยกว่า แสดงว่ามีรหัสพันธุกรรมที่ขาดหายไป (มัซซุพร, 2556)

สำหรับครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคทางพันธุกรรมร้ายแรงและภาวะความผิดปกติทางด้านจำนวนโครโมโซมของตัวอ่อนสามารถใช้เทคนิค CGH คัดกรองได้ เช่น การตรวจการขาดหายไปของยีน

alpha และ beta-thalassemia (Phylipsen *et al.*, 2012; Blattner *et al.*, 2013) การเพิ่มและขาดหายของยีน dystrophin ทำให้เกิดโรค Duchenne and Becker muscular dystrophies (DMD and BMD) (Hegde *et al.*, 2008; Marquis-Nicholson *et al.*, 2013) การเพิ่มและขาดหายของยีน *factor 8* ของโรค hemophilia A (Lannoy *et al.*, 2013) เป็นต้น แต่มีข้อจำกัดคือสามารถใช้ตรวจสอบการเพิ่มหรือขาดหายของยีนที่มีขนาดใหญ่เท่านั้น ไม่สามารถใช้ตรวจสอบการกลายแบบ point mutation ได้ จึงได้มีการนำเทคนิค CGH มาทำร่วมกับเทคนิค PCR ในที่นี้จะขอเรียกว่าเทคนิค CGH-PCR อันทำให้สามารถตรวจสอบทั้งการกลายระดับโครโมโซมและการกลายระดับยีนได้พร้อมกัน

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นโรคพันธุกรรมทางโลหิตวิทยาซึ่งมีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย ประมาณร้อยละ 20-30 ของประชากรมียีน *HBA1*, *HBA2* (alpha (a)-thalassemia) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 16 ร้อยละ 3-9 ของยีน *HBB* (beta (b)-thalassemia) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 11 ความรุนแรงของโรคจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของการกลายพันธุ์ของยีนแต่ละยีนและตำแหน่งการเกิดการกลายพันธุ์อีกด้วย ในผู้ป่วยที่มีอาการของโรคที่รุนแรง (major thalassemia) ในโรค beta thalassemia เป็นส่วนใหญ่ผู้ป่วยในกลุ่มนี้จะได้รับการรักษาแบบประคับประคองแต่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ (วรวรรณ, 2549) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการใช้เทคนิคการเจริญพันธุ์ในการป้องกันประชากรกลุ่มใหม่ไม่ให้เป็นโรค beta thalassemia โดยตรวจคัดกรองตัวอ่อนโดยใช้เทคนิค CGH-PCR เพื่อให้การตั้งครรภ์ที่สมบูรณ์ปราศจากโรคทางพันธุกรรมและโครโมโซมที่ปกติ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่างดีเอ็นเอ

คนไข้จำนวน 8 ครอบครัว ที่มาใช้บริการตรวจคัดกรองโรค beta-thalassemia ในตัวอ่อนโดยใช้เทคนิค CGH-PCR ทำการซักประวัติอิกทั้งขอผลรายงานการกลาย (mutation report) และขอตัวอย่างดีเอ็นเอจากคนไข้ในแต่ละครอบครัว โดยให้มีการลงนามยินยอมการตรวจสอบสารพันธุกรรม

### การเตรียมชุดน้ำยาตรวจสอบพันธุกรรมด้วยวิธี PCR

นำดีเอ็นเอคนไข้มาตรวจยืนยันผลการเกิดการกลาย (NM\_000518) ในตำแหน่งที่มีในรายงานการกลายอีกครั้งเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการเกิดการกลายจากนั้นจะมีการเตรียมชุดน้ำยาที่เหมาะสมกับคนไข้เพื่อใช้ตรวจหาการกลายในตัวอย่าง โดยชุดน้ำยานี้จะประกอบไปด้วยไพรเมอร์หลายคู่ ทั้งแบบ linkage analysis (SSR markers) และ direct mutation เพื่อเพิ่มความถูกต้องในการตรวจคัดกรองตัวอย่าง

### การตรวจความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมในตัวอย่าง

นำเซลล์ตัวอย่างที่จะทำการตรวจคัดกรองพันธุกรรม มาทดสอบด้วยเทคนิค CGH ของ 24 Sure illumina® โดยมีขั้นตอนดังนี้ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง genomic sequence ด้วยวิธี PCR-based WGA จากนั้นตัดสีของ DNA test และดีเอ็นเอควบคุม ด้วยที่ นำ DNA ของ test และดีเอ็นเอควบคุมมาผสมกัน แล้วนำมาทำ hybridization array CGH ซึ่งเป็นการแบ่งส่วนของโครโมโซมให้เล็กลงและ spot ลงบนสไลด์ จากนั้นนำสไลด์ที่ผ่านการ hybridization แล้วมาล้าง unhybridized DNA ออกหลังผ่านการล้างแล้วนำสไลด์มา scan ด้วยเครื่อง scanner แปลผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม BlueFuse Multi version 4.1

### การตรวจความผิดปกติของยีนธาลัสซีเมีย

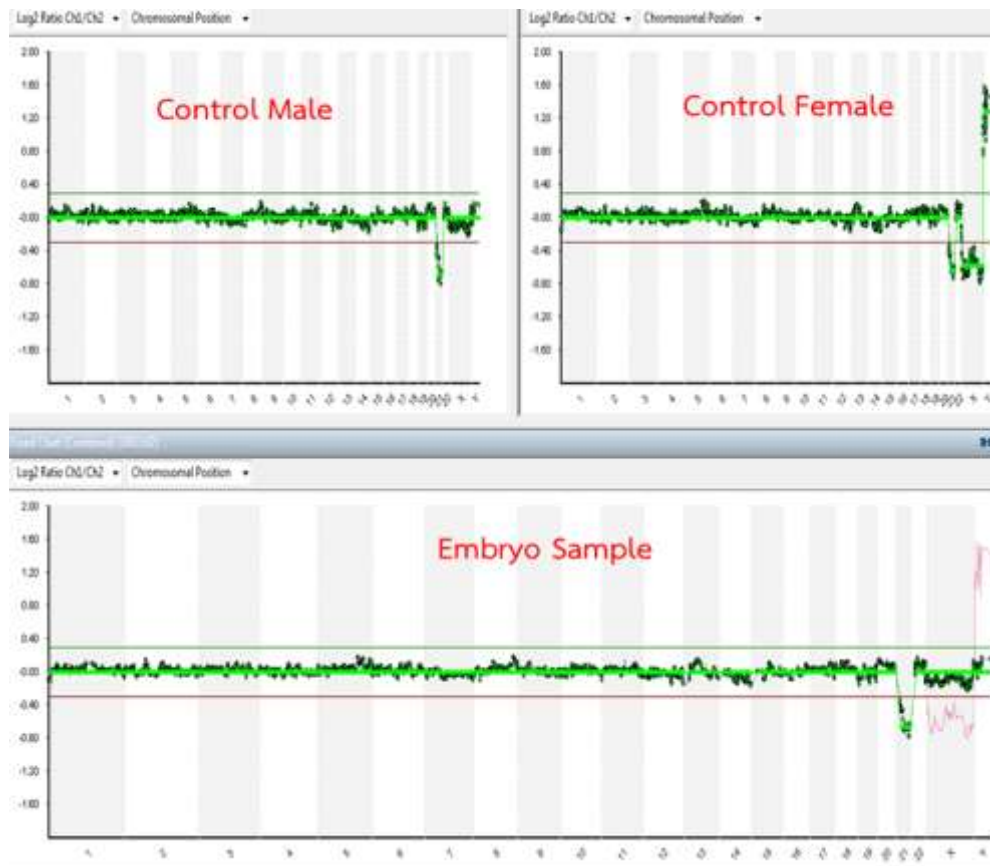
นำตัวอย่างที่มีโครโมโซมปกติมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดน้ำยาที่เตรียมไว้ประกอบไปด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ในชุดแรกเป็นไพรเมอร์สำหรับ linkage analysis (SSR markers) ที่ติดตามร่องแสงไว้ที่ไพรเมอร์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR แยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้เครื่อง ABI 3130 อ่านขนาดดีเอ็นเอที่ได้ แล้วแปลผลการถ่ายทอดโครโมโซมโดยการสร้าง haplotype (Zachaki *et al.*, 2011) ชุดหลังเป็นไพรเมอร์สำหรับ direct analysis โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ตรงตำแหน่งการเกิดการกลาย การหาลำดับเบสโดยใช้สารเคมีชุด ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ร่วมกับไพรเมอร์แต่ละตำแหน่งการกลาย แล้วทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย sephadex column หาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง ABI 3130 อ่านลำดับเบสที่ได้และแปลผล (Chan *et al.*, 2010)

### ผลการทดลองและวิจารณ์

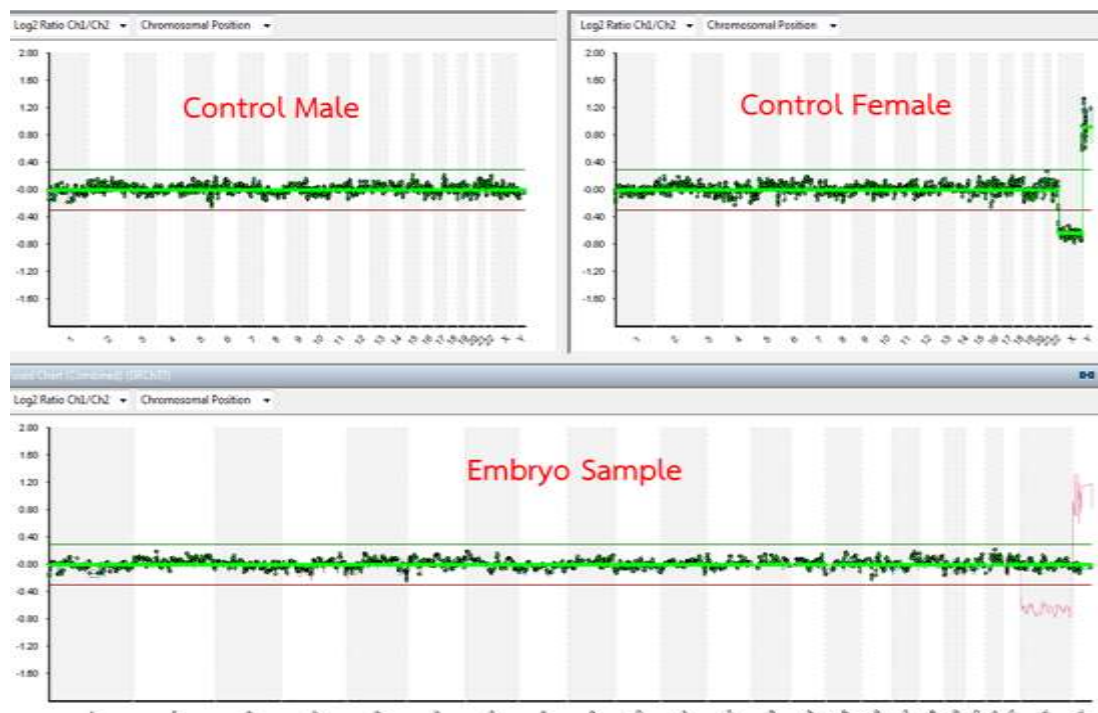
จากการตรวจคัดกรองตัวอย่างด้วยเทคนิค CGH-PCR ใน beta-thalassemia 8 ครอบครัว พบว่าสามารถคัดกรองตัวอย่างที่มีความผิดปกติทางโครโมโซม (Figure 1) ออกจากตัวอย่างที่มีโครโมโซมปกติ (Figure 2) ได้ด้วยการใช้เทคนิค CGH เมื่อมีตัวอย่างที่มีโครโมโซมปกติจะนำมาทดสอบต่อกับ primer mix ที่เหมาะสมในแต่ละครอบครัว พบว่าในการทดสอบการกลายในยีน *HBB* นั้น สามารถตรวจสอบด้วยการทำ linkage analysis ที่ใช้ติดตามโครโมโซมที่มียื่นก่อกลายพันธุ์ได้ (Figure 3, Table 1) จากขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ทำให้ทราบว่าตัวอย่างใดมีโครโมโซมที่มียื่นก่อกลายพันธุ์อยู่ จากนั้นจะยืนยันผลด้วยการตรวจการกลายของยีนด้วยการหาลำดับเบส (Figure 4) เพื่อลดความผิดพลาดในการแปลผลจากการเกิด crossing over และ allele dropout

ในการทดสอบการเกิดการกลายในยีน *HBB* ด้วยเทคนิค PCR เพียงอย่างเดียวพบว่า สามารถใช้คัดกรองตัวอย่างที่มีความผิดปกติของยีนได้ดี แต่ไม่สามารถคัดกรองตัวอย่างที่ผิดปกติทางโครโมโซมได้ ทำให้มีตัวอย่างที่มียื่นปกติแต่อาจมีความผิดปกติของโครโมโซมเกิดขึ้นได้ ตัวอย่างที่ใส่กลับให้คนไข้อาจมีโอกาสตั้งครรรค์ตัวอย่างที่มีความผิดปกติของโครโมโซมได้ ซึ่งทำให้ตัวอย่างไม่สามารถเจริญเติบโตในครรภ์ทำให้แท้งได้ (Papageorgiou and Patsalis, 2012) ซึ่งข้อมูลจากศูนย์ Superior A.R.T. ตั้งแต่ปี 2008 พบว่ามีคนไข้ที่มากัดกรองตัวอย่างในโรค beta-thalassemia ด้วยเทคนิค PCR เพียงอย่างเดียวจำนวน 23 ครอบครัว มีอัตราการตั้งครรรค์เพียง 53%

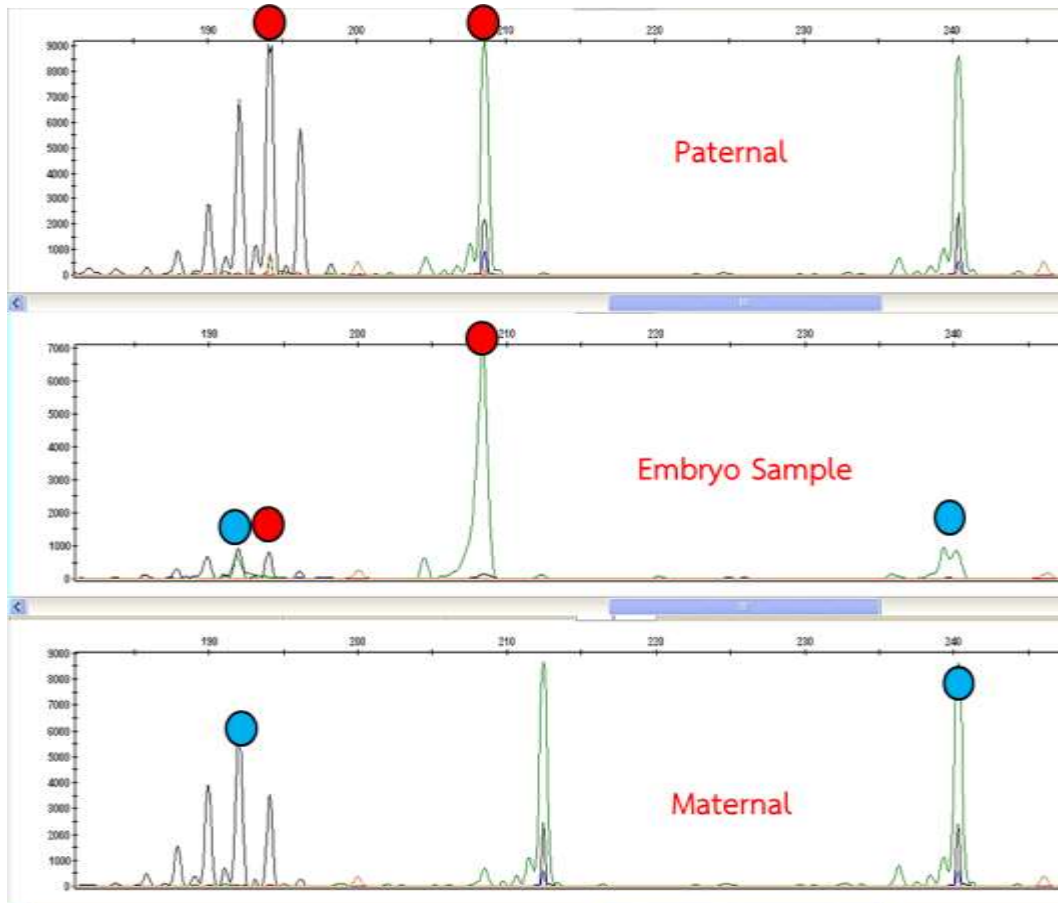
ส่วนเทคนิค CGH-PCR จากการคัดกรองตัวอย่างในคนไข้ 8 ครอบครัว (Table 1) พบ 2 ครอบครัว (#3,6) ได้ตัวอย่างที่มีโครโมโซมปกติแต่มียื่นแฝงของโรค beta-thalassemia จำนวน 3 ตัว และ 2 ตัว ตามลำดับ มี 1 ครอบครัวที่ตัวอย่างมีโครโมโซมผิดปกติ และพบ 5 ครอบครัว (#1,2,4,7,8) ได้ตัวอย่างที่มีโครโมโซมและยื่นปกติ และได้ใส่กลับคืนสู่คนไข้ พบว่าทั้ง 5 ครอบครัวมีการตั้งครรรค์ ซึ่งคิดเป็นอัตราการตั้งครรรค์ 100% (Superior A.R.T.)



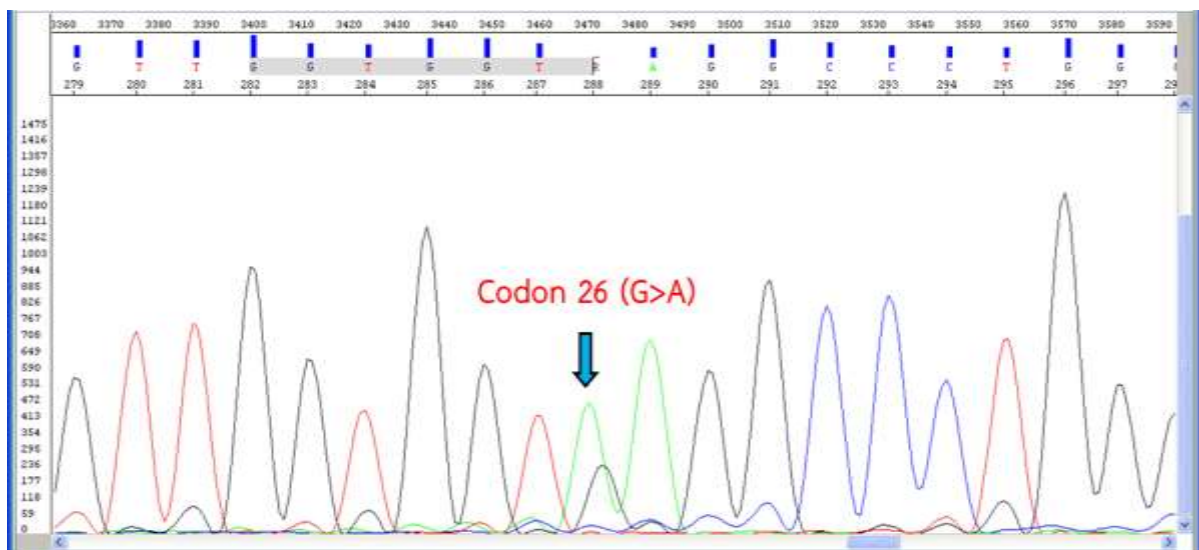
**Figure 1** CGH analysis of an abnormal sample with monosomy 21. The top panels are control male and female samples and the bottom panel is the embryo sample.



**Figure 2** CGH analysis of a normal sample. The top panels are control male and female samples and the bottom panel is the embryo sample.



**Figure 3** The amplified DNA bands of the father (top, red circle), the embryo sample (middle) and the mother (bottom, blue circle) by the linkage analysis.



**Figure 4** DNA sequence of the *HBB* gene by direct mutation analysis showing the G>A change at codon 26.

**Table 1** Embryonic screening results of 8 families by CGH-PCR technique.

Patient	Number Embryos (n)	CGH		PCR		
		NAD (%)	ABN (%)	NAD (%)	Carrier (%)	AFF (%)
1	10	5 (50%)	5 (50%)	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)
2	11	4 (36%)	7 (63%)	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)
3	13	4 (31%)	9 (69%)	0 (0%)	3 (75%)	1 (25%)
4	7	3 (43%)	4 (57%)	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)
5	1	0 (0%)	1 (100%)	-	-	-
6	6	2 (33%)	4 (67%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
7	6	5 (83%)	1 (17%)	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)
8	15	9 (60%)	6 (40%)	2 (22%)	5 (56%)	2 (22%)

NAD = No Abnormality Detected, ABN = Abnormal, AFF = Affected

### สรุปผลการวิจัย

จากผลการตรวจคัดกรองตัวอ่อนในคนไข้ beta-thalassemia ทั้ง 8 ครอบครัว ผลการตรวจโครโมโซมด้วยเทคนิค CGH สามารถแยกตัวอ่อนที่มีโครโมโซมผิดปกติออกได้ เมื่อนำตัวอ่อนที่มีโครโมโซมปกติมาตรวจคัดกรองการเกิดการกลายในยีน *HBB* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า linkage analysis ใช้ตรวจติดตามโครโมโซมที่มีความผิดปกติได้อย่างดี สอดคล้องกับการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ direct mutation ทำให้สามารถใช้คัดกรองตัวอ่อนได้อย่างแม่นยำ อีกทั้งมีอัตราการตั้งครรภ์ที่สูงขึ้นเนื่องจากความสมบูรณ์ของตัวอ่อนที่ปกติทั้งจำนวนโครโมโซมและยีน เมื่อเทียบเทียบกับการใช้เทคนิค PCR เพียงอย่างเดียว เนื่องจากตัวอ่อนที่มียีนปกติแต่มีจำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติก็จะส่งผลต่อการตั้งครรภ์ ดังมีงานวิจัยว่าความสมบูรณ์ของโครโมโซมส่งผลต่อการตั้งครรภ์ที่ดี (Chitayat *et al.*, 2011) เช่นเดียวกันตัวอ่อนที่มีโครโมโซมปกติอาจมียีนที่ก่อให้เกิดโรค beta-thalassemia ได้ ดังนั้นเทคนิค CGH-PCR ทำให้สามารถได้ตัวอ่อนที่ปกติและสมบูรณ์มากกว่าการใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่ง

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท Superior A.R.T. (โอโอโกเนีย) จำกัด ตัวอย่างเลือดของคนไข้ได้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการจริยธรรมตามกฎของแพทย์สภา โดย Superior A.R.T.

### เอกสารอ้างอิง

- มัธขุพร สุขประเสริฐ (2556) New Perspectives on Molecular genetic analysis. สหุติศาสตรนรีเวชวิทยา สารปีที่ 12 ฉบับที่ 2. คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาล รามาธิบดี, กรุงเทพฯ.
- วรวรรณ ตันไพจิตร (2549) แนวทางการวินิจฉัยและการรักษาโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย พ.ศ. 2549. มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย
- Blattner A, Brunner-Agten S, Ludin K, Hergersberg M, Herklotz R, Huber AR, Rothlisberger B (2013) Detection of germline rearrangements in patients with  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia using high resolution array CGH. *Blood Cells Mol Dis* 51: 39–47.
- Chan OT, Westover KD, Dietz L, Zehnder JL, Schrijver I (2010) Comprehensive and efficient HBB mutation analysis for detection of beta-hemoglobinopathies in a pan-ethnic population. *Am J Clin Pathol.* 133: 700–707
- Chitayat D1, Langlois S, Wilson RD (2011) Prenatal screening for fetal aneuploidy in singleton pregnancies. *J Obstet Gynaecol Can.* 33: 736–750.
- Hegde MR, Chin EL, Mülle JG, Okou DT, Warren ST, Zwick ME (2008) Microarray-based mutation detection in the dystrophin gene. *Hum Mutat* 29: 1091–1099.

- Lannoy N, Grisart B, Eeckhoudt S, Verellen-Dumoulin C, Lambert C, Vikkula M, Hermans C (2013) Intron 22 homologous regions are implicated in exons 1-22 duplications of the F8 gene. *Eur J Hum Genet* 21: 970–976.
- Marquis-Nicholson R, Lai D, Lan CC, Love JM, Love DR (2013) A Streamlined Protocol for Molecular Testing of the DMD Gene within a Diagnostic Laboratory: A Combination of Array Comparative Genomic Hybridization and Bidirectional Sequence Analysis. *ISRN Neurol*.
- Papageorgiou EA, Patsalis PC (2012). Non-invasive prenatal diagnosis of aneuploidies: new technologies and clinical applications. *Genome Med* 4: 46.
- Phylipsen M, Chaibunruang A, Vogelaar IP, Balak JR, Schaap RA, Ariyurek Y, Fucharoen S, den Dunnen JT, Giordano PC, Bakker E, *et al.* (2012) Fine-tiling array CGH to improve diagnostics for  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia rearrangements. *Hum Mutat* 33: 272–280.
- Zachaki S, Vrettou C, Destouni A, Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E. (2011) Novel and known microsatellite markers within the  $\beta$ -globin cluster to support robust preimplantation genetic diagnosis of  $\beta$ -thalassemia and sickle cell syndromes. *Hemoglobin*. 35: 56–66.