

การพัฒนาวิธี Allele-specific PCR เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *VKORC1* แบบ -1639G > A และ 1173C > T สำหรับการรักษาด้วยยาว่าร์ฟาริน

Development of an Allele-specific PCR for Detection of *VKORC1* -1639G > A and 1173C > T for Warfarin Therapy

วิศรุต จ้อนเจิม¹, อรุณรุต วนิชชานนท์^{2*} และอารีรัตน์ หนูนวนล³

Witsarut Jonjerm¹, Arunrut Vanichanon^{2*} and Areerat Hnoonual³

บทคัดย่อ

ยาว่าร์ฟารินเป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือด ซึ่งมีช่วงการรักษาแคบและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *VKORC1* มีผลต่อการตอบสนองของยา โดยเฉพาะตำแหน่งสลับ -1639G > A (rs9923231) และ 1173C > T (rs9934438) มีความจำเป็นต้องการศึกษาเพื่อพิจารณาปริมาณยาที่เหมาะสม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย Allele-specific PCR (AS-PCR) โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *VKORC1* เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งดังกล่าว พร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.25 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเหมาะสมสำหรับทุกคู่ไพรเมอร์ ส่วนอุณหภูมิสำหรับ Annealing ต่างกัน พบว่าอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์คู่มีวแทนท์ และไพรเมอร์คู่ควบคุมที่สลับตำแหน่ง -1639G > A ในขณะที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์และสลับตำแหน่ง 1173C > T ทุกคู่ไพรเมอร์ ผลผลิตพีซีอาร์ยืนยันผลด้วยวิธี DNA Sequencing ผลการทดสอบมีความสอดคล้องกัน 100 % กับลำดับเบสของยีน *VKORC1* ดังนั้น AS-PCR ที่พัฒนาสามารถใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *VKORC1* เพื่อพิจารณาปรับปริมาณยาว่าร์ฟารินในการรักษาได้

คำสำคัญ: Allele-specific PCR (AS-PCR) ยีน *VKORC1* ยาว่าร์ฟาริน

¹ นิสิตปริญญาตรี, หลักสูตรการศึกษามัธยมศึกษา (กศ.บ.) วิชาเอกชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา 90000

² อ.ดร., สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา 90000

³ อ.ดร., ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

¹ Undergraduate Student, Bachelor of Education Program (B.Ed.), Major in Biology, Faculty of Education, Thaksin University, Songkla, 90000, Thailand

² Lecturer Dr., Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University, Songkla, 90000, Thailand

³ Lecturer Dr., Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Songkla, 90110, Thailand

* Corresponding author: Tel: 08-8790-9294. Email address: varunrut@tsu.ac.th

(Received: April 21, 2020; Revised: July 29, 2020; Accepted: August 4, 2020)

Abstract

Warfarin is an anticoagulant drug, which has a narrow therapeutic index *VKORC1* gene polymorphisms [(-1639G > A (rs9923231) and 1173C > T (rs9934438)] affect drug responses that need to be considered for warfarin dosage requirement. Therefore, the objective of this study was to develop Allele-specific PCR (AS-PCR). Firstly, specific primers for *VKORC1* gene were designed. PCR optimization was performed by varying annealing temperature. The results showed that 1.25 mM MgCl₂ was suitable for all primers. At -1639G > A, 65°C was suitable annealing temperature for mutant and control primers. Whereas, 57°C was suitable annealing temperature for wildtype primers and all primer pairs in another position, 1173C > T. PCR products were validated by DNA sequencing, resulting in 100% homology. In conclusion, the newly developed AS-PCR could use for *VKORC1* genotype detection to adjust for warfarin dosage.

Keywords: Allele-specific PCR (AS-PCR), *VKORC1* gene, Warfarin

บทนำ

ยาว่าร์ฟาริน (Warfarin) จัดเป็นยาในกลุ่มต้านการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant) ออกฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่อาศัยวิตามินเค (Vitamin K Dependent Clotting Factor) [1] ได้แก่ Clotting Factor II, VII, IX และ X โดยยาจะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ Vitamin K Epoxide Reductase (VKORC) ซึ่งมีหน้าที่ในการผันกลับของวิตามินเคมาใช้ใหม่ [2] การใช้ยาว่าร์ฟารินต้องคำนึงถึงข้อควรระวังทางคลินิก เนื่องจากมีดัชนีการรักษาแคบ (Narrow Therapeutic Index) มีโอกาสเกิดพิษของยาได้ง่าย จึงต้องติดตามประเมินประสิทธิภาพและความเป็นพิษของยาอย่างสม่ำเสมอ เพื่อปรับระดับยาให้เหมาะสม โดยวัดจากค่า INR (International Normalized Ratio) ช่วงของการรักษาที่เหมาะสมประมาณ 2-3 หากได้ค่าน้อยกว่า 2 บ่งชี้ว่ามีโอกาสเกิดลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด และหากได้ค่าสูงเกิน 3 อาจทำให้เกิดภาวะเลือดออกผิดปกติ (Bleeding) [3] ส่งผลให้การระบุนขนาดของยาและการจัดการเป็นไปได้ยาก ยาว่าร์ฟารินส่วนใหญ่มักใช้สำหรับการป้องกันและรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular Diseases; CVDs) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่คร่าชีวิตคนไทย โดยเฉพาะภาวะลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือด (Venous Thromboembolism; VTE) เป็นภาวะเสี่ยงพบในประชากรผู้สูงอายุ

การตอบสนองของยาว่าร์ฟารินเป็นผลมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น อาหาร โดยเฉพาะอาหารที่มีปริมาณวิตามินเคสูง การเกิดอันตรกิริยา (Interaction) กับยาอื่น เช่น Celecoxib ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบ อายุ เพศ [4] และปัจจัยด้านพันธุกรรมซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญ คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนมีผลต่อการตอบสนองขนาดของยาว่าร์ฟารินที่แตกต่างกันถึงร้อยละ 30-50 [5] เช่น การกลายพันธุ์ (Mutation) ของยีน *CYP2C9* ที่ควบคุมการสร้าง Cytochrome P450 2C9 ซึ่งเป็น Hepatic Microsomal Enzyme มีหน้าที่ในการกำจัดยา และการกลายพันธุ์ของยีน *VKORC1* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ Vitamin K Oxide Reductase ในคนแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกัน [1] โดยเฉพาะในประชากรเอเชียมีความแปรผันของยีน *VKORC1* มากกว่าประชากรยุโรป อเมริกันและแอฟริกัน-อเมริกัน แม้ว่ามีการรายงานตำแหน่งสลับของยีนที่พบหลายตำแหน่ง แต่มีสองตำแหน่งที่สำคัญ คือ -1639G > A (rs9923231) และ 1173C > T (rs9934438) ที่มีอิทธิพลต่อการให้ปริมาณยาว่าร์ฟารินเป็นอย่างมาก [6]

โดยทั่วไปการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *VKORC1* นิยมใช้เทคนิค PCR-RFLP โดยจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme) มีราคาสูงพร้อมทั้งขั้นตอนยุ่งยาก และใช้เวลานานค่อนข้างนาน ส่วน Real-Time PCR เป็นเทคนิคที่มีต้นทุนสูงและต้องใช้เครื่องมือพีซีอาร์ที่มีราคาสูง [7] นอกจากนี้ ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลที่ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมมีจำนวนจำกัด ส่งผลต่อภาระงานที่หนักและการออกผลการทดสอบให้แก่ผู้รับบริการเป็นไปได้ช้าเพื่อลดปัญหาดังกล่าวและการให้บริการแก่ผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย Allele-specific PCR ที่อาศัยความจำเพาะของไพรเมอร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *VKORC1*

วิธีดำเนินการ

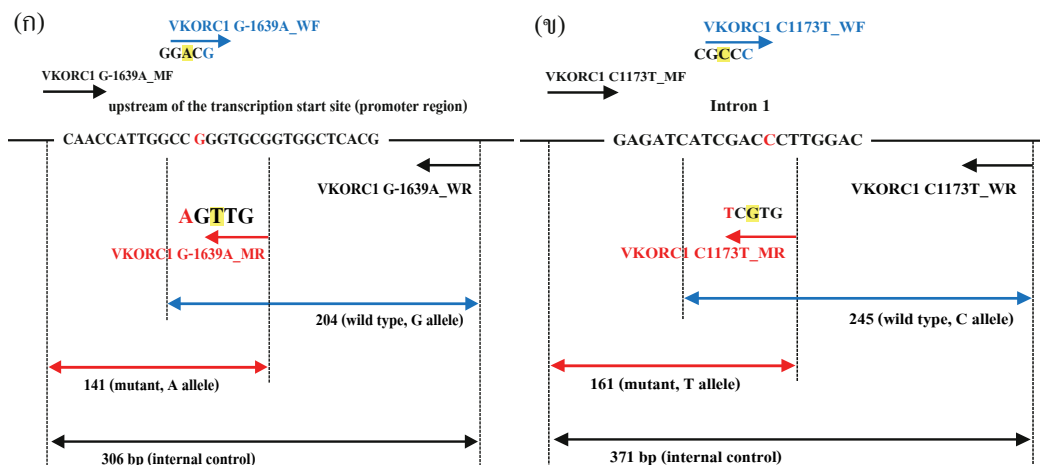
การศึกษาครั้งนี้เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ (Primer) ที่มีความจำเพาะต่อยีน *VKORC1* ที่สโนิปส์ตำแหน่ง -1639G > A (rs9923231) และ 1173C > T (rs9934438) ดังภาพที่ 1 และตารางที่ 1 โดยในการออกแบบไพรเมอร์นั้นใช้หลักการจากงานวิจัยพืชวงศ์ผักกาด โดยมีหลักการออกแบบคือปลาย 3' ของไพรเมอร์จะต้องมีความจำเพาะกับจีโนไทป์ที่เป็น Wildtype และ Mutant ของสโนิปส์แต่ละตำแหน่ง [8] ตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Vector NTI และ NCBI Primer-BLAST อีกทั้งคำนวณอุณหภูมิขั้นตอน Annealing แล้วหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างของมนุษย์ที่ทราบจีโนไทป์แล้ว (Known Sample) ด้วยเทคนิค Allele-specific PCR แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรส (Agarose Gel Electrophoresis) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของมนุษย์ด้วย QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) วัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ขั้นตอนการทำ Allele - specific PCR กำหนดปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ปริมาณ ดีเอ็นเอตัวอย่าง 50 นาโนกรัม Betaine (Adjuvant) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ Forward Primer ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ Reverse Primer ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.25 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ และ Taq DNA Polymerase (Immulaase) 0.5 ยูนิต สภาวะสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง Thermal Cycler ประกอบด้วยขั้นตอน 1) Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที 2) Denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) Annealing กำหนดอุณหภูมิสำหรับการ Optimization ต่างกันดังต่อไปนี้ 57 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ที่สภาวะ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลาย Ethidium Bromide และถ่ายภาพภายใต้ UV Transluminator โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังที่ตำแหน่งสโนิปส์ -1639G > A หากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 306 204 และ 141 คู่เบส หมายความว่า ตัวอย่างนั้นมีจีโนไทป์แบบ Heterozygous (G/A) หากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 306 และ 204 คู่เบส หมายความว่า มีจีโนไทป์แบบ Homozygous Wildtype (G/G) และหากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 306 และ 141 คู่เบส หมายความว่า มีจีโนไทป์แบบ Homozygous Mutant (A/A) ส่วนที่ตำแหน่งสโนิปส์ 1173C > T หากปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ขนาด 371 245 และ 161 คู่เบส หมายความว่า ตัวอย่างนั้นมีจีโนไทป์แบบ Heterozygous (C/T) หากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 371 และ 245 คู่เบส หมายความว่า มีจีโนไทป์แบบ Homozygous Wildtype (C/C) และหากปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 371 และ 161 คู่เบส หมายความว่า มีจีโนไทป์แบบ Homozygous Mutant (T/T) ดังตารางที่ 2 ค่อยมานำผลผลิตพีซีอาร์แต่ละขนาดจากการทำ Allele-specific PCR ของดีเอ็นเอมนุษย์แต่ละตัวอย่าง ทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์ (Purification) โดยนำเจลไปตัดเอาเฉพาะส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการ และแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ออกจากเจลด้วยวิธี Crush and Soak [7] ยืนยันผลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sanger DNA Sequencing) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI3500 Automate Sequencer ณ หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลการวิจัย

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR Optimization) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างของคนทีทราบจีโนไทป์ จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 โดยสนิปส์ทั้ง 2 ตำแหน่งของยีน *VKORC1* คือ -1639G > A (rs9923231) และ 1173C > T (rs9934438) ซึ่งทดสอบแยกคู่ไพรเมอร์สนิปส์ละ 3 คู่ ได้แก่ Wildtype Forward และ Wildtype Reverse, Mutant Forward และ Mutant Reverse และคู่ไพรเมอร์ Mutant Forward และ Wildtype Reverse ซึ่งใช้สำหรับการควบคุม (Control Band) ปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละครั้ง



ภาพที่ 1 ขอบเขตของยีน *VKORC1* ที่ระบุตำแหน่งไพรเมอร์ของ สนิปส์ตำแหน่ง -1639G > A (ก) และสนิปส์ตำแหน่ง 1173C > T (ข)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายของยีน *VKORC1*

ชื่อตำแหน่งพหุสัณฐาน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (bp)
C.-1639G > A rs9923231	VKORC1 G-1639A_WF	ACCTGAAAAACAACCATTTGGACG	204
	VKORC1 G-1639A_WR	CTCAGCCTCCCAAGTAGTTTGG	
	VKORC1 G-1639A_MF	AGCCAGCAGGAGAGGGAAATAT	141
	VKORC1 G-1639A_MR	CGTGAGCCACCGCAACT	
C.1173C > T rs9934438	VKORC1 C1173T_WF	CCAGGAGATCATCGCCC	245
	VKORC1 C1173T_WR	GTGTAGAAGATGCAACCGAAT	
	VKORC1 C1173T_MF	GAGACTTACTTAAGGTCTAAGATGAA	161
	VKORC1 C1173T_MR	CTCCCATCCTAGTCCACGA	

หมายเหตุ: Internal Control ของ C.-1639G > A (rs9923231) ได้แก่ ไพรเมอร์ *VKORC1* G-1639A_MF (Mutant Forward) กับ *VKORC1* G-1639A_WR (Wildtype Reverse) ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 306 bp และ C.1173 C > T (rs9934438) ได้แก่ ไพรเมอร์ *VKORC1* C1173T_MF (Mutant Forward) กับ *VKORC1* C1173T_WR (Wildtype Reverse) ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 371 bp

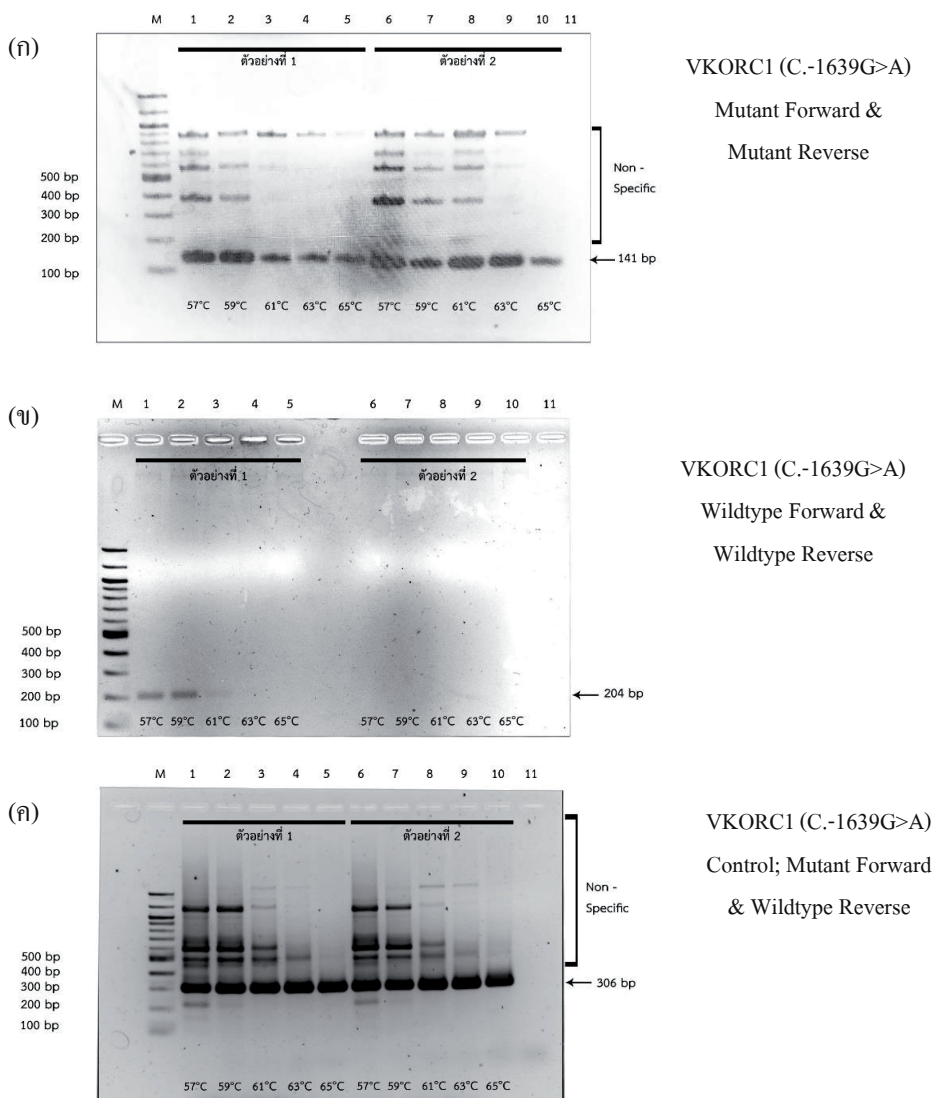
ตารางที่ 2 ตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ซึ่งทราบจีโนไทป์แล้ว ที่ใช้ทดสอบคู่ไพรเมอร์ของยีน *VKORC1* ตำแหน่ง สนิปส์ -1639G > A (rs9923231) และ 1173C > T (rs9934438)

ตัวอย่างดีเอ็นเอ	จีโนไทป์ สำหรับตำแหน่งสนิปส์ของ ยีน <i>VKORC1</i>	
	-1639G > A (rs9923231)	1173C > T (rs9934438)
1	Heterozygote (G/A)	Heterozygote (C/T)
2	Homozygous Mutant (A/A)	Homozygous Mutant (T/T)

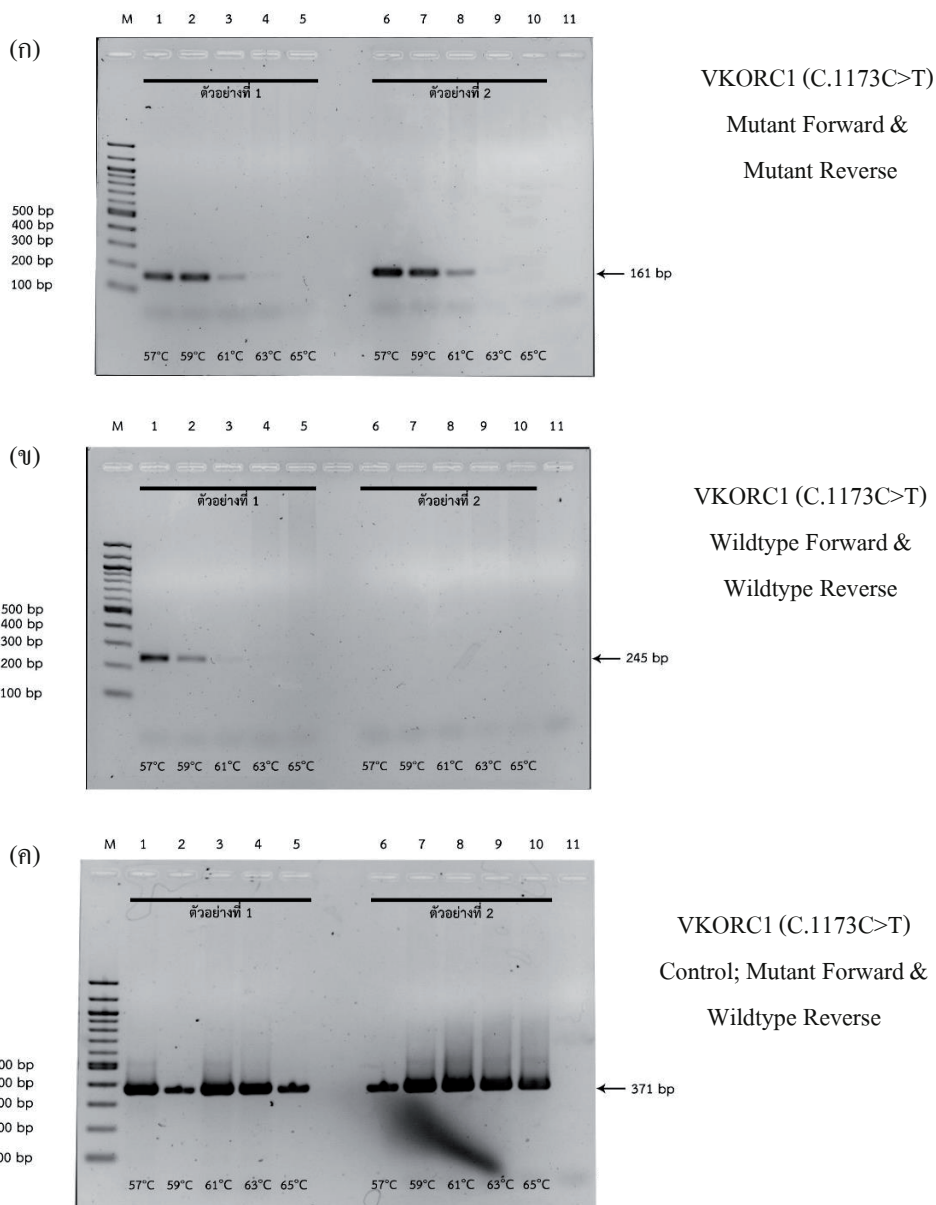
ยีน *VKORC1* ที่สนิปส์ตำแหน่ง -1639G > A (rs9923231) จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ตัวอย่างที่ 1 (มีจีโนไทป์แบบ G/A) และตัวอย่างที่ 2 (มีจีโนไทป์แบบ A/A) กำหนดความแตกต่างของอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ดังนี้ 57 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์คู่แรก คือ Mutant Forward และ Mutant Reverse ผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 141 คู่เบส ทุกอุณหภูมิทั้งสองตัวอย่าง พร้อมทั้งผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะ (Non-specific PCR Product) จำนวนมากในอุณหภูมิ 57 59 61 และ 63 องศาเซลเซียส ส่วนในอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปรากฏผลผลิต พีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะเพียง 1 แถบในตัวอย่างที่ 1 แต่มีขนาดแตกต่างจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการมาก จึงสามารถแยกจากกันได้อย่างชัดเจน จึงสรุปได้ว่า อุณหภูมิขั้นตอน Annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 2 ก) ไพรเมอร์คู่ที่สอง คือ Wildtype Forward และ Wildtype Reverse ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 204 คู่เบสชัดเจนในอุณหภูมิ 57 และ 59 องศาเซลเซียส แถบสีจางในอุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส และไม่ปรากฏแถบลักษณะที่อุณหภูมิ 63 และ 65 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างที่ 1 แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอทุกอุณหภูมิใน

ตัวอย่างที่ 2 ในขณะที่เดียวกันไม่ปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะในทุกอุณหภูมิทั้งสองตัวอย่าง สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิขั้นตอน Annealing ที่ 57 และ 59 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 2 ข) ไพรเมอร์คู่ Control; Mutant Forward และ Wildtype Reverse ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 306 คู่เบส ทุกอุณหภูมิทั้งสองตัวอย่าง ในขณะที่เดียวกันปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะในอุณหภูมิ 57 59 61 และ 63 องศาเซลเซียส แต่ไม่ปรากฏในอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทั้งสองตัวอย่าง สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิขั้นตอน Annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 2 ค)

ยีน *VKORC1* ที่สปีส์ตำแหน่ง 1173C > T (rs9934438) จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ตัวอย่างที่ 1 (มีจีโนไทป์แบบ C/T) และตัวอย่างที่ 2 (มีจีโนไทป์แบบ T/T) โดยกำหนดความแตกต่างของอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ดังนี้ 57 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่า คู่ไพรเมอร์ Mutant Forward และ Mutant Reverse ผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบสอย่างชัดเจนในที่อุณหภูมิ 57 และ 59 องศาเซลเซียส ขณะที่เกิดแถบจางๆ ที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส และไม่ปรากฏแถบดังกล่าวที่อุณหภูมิ 63 และ 65 องศาเซลเซียส ทั้งสองตัวอย่าง (ภาพที่ 3 ก) ขณะที่คู่ไพรเมอร์ Wildtype Forward และ Wildtype Reverse ผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 245 คู่เบส อย่างชัดเจนที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเกิดแถบสีจางที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส และไม่ปรากฏแถบดังกล่าวที่อุณหภูมิ 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างที่ 1 เท่านั้น อีกทั้งไม่ปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะทุกอุณหภูมิทั้ง 2 ตัวอย่าง สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิขั้นตอน Annealing ที่ 57 องศาเซลเซียส เหมาะสมกับปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์คู่ Wildtype (ภาพที่ 3 ข) และสุดท้าย ไพรเมอร์คู่ควบคุม Mutant Forward และ Wildtype Reverse ผลิตแถบดีเอ็นเอขนาด 371 คู่เบส ทุกอุณหภูมิทั้งสองตัวอย่าง ในขณะที่เดียวกันไม่ปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะในทุกอุณหภูมิทั้งสองตัวอย่าง สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิขั้นตอน Annealing ที่ 57 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์คู่ควบคุม (ภาพที่ 3 ค)



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *VKORC1* ที่สลับตำแหน่ง -1639G > A (ก) ใช้คู่ไพรเมอร์ Mutant Forward และ Mutant Reverse ขนาด 141 คู่เบส (ข) ใช้คู่ไพรเมอร์ Wildtype Forward และ Wildtype Reverse ขนาด 204 คู่เบส และ (ค) ใช้ไพรเมอร์คู่ Control; Mutant Forward และ Wildtype Reverse ขนาด 306 คู่เบส ซึ่ง Lane M แทน 100 คู่เบส DNA Marker; Lanes 1-5 แทนตัวอย่างที่ 1 โดยอุณหภูมิขั้นตอน Annealing ได้แก่ 57 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Lanes 6-10 แทนตัวอย่างที่ 2 โดยอุณหภูมิขั้นตอน Annealing ได้แก่ 57 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับสุดท้าย คือ Lane 11 แทนกลุ่มควบคุมแบบลบ (No Template DNA)



ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *VKORC1* ที่สปีดตำแหน่ง 1173C > T (ก) ใช้คู่ไพรเมอร์ Mutant Forward และ Mutant Reverse ขนาด 161 คู่เบส (ข) ใช้คู่ไพรเมอร์ Wildtype Forward และ Wildtype Reverse ขนาด 245 และ (ค) ใช้คู่ไพรเมอร์ Control; Mutant Forward และ Wildtype Reverse ขนาด 371 คู่เบส ซึ่ง Lane M แทน 100 คู่เบส DNA Marker; Lanes 1-5 แทนตัวอย่างที่ 1 โดยอุณหภูมิขั้นตอน Annealing ได้แก่ 57 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Lanes 6-10 แทนตัวอย่างที่ 2 โดยอุณหภูมิขั้นตอน Annealing ได้แก่ 57 59 61 63 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สุดท้ายคือ Lane 11 แทนกลุ่มควบคุมแบบลบ (No Template DNA)

อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 1 ที่สนิปส์ตำแหน่ง -1639G > A (rs9923231) ไพรเมอร์คู่แรก คือ Mutant Forward และ Mutant Reverse ปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะ แต่ไพรเมอร์คู่ Wildtype Forward และ Wildtype Reverse ปรากฏเพียงผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะ ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะอาจเกิดจากปริมาณสาร $MgCl_2$ มากเกินไป ส่งผลต่อการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่จำเพาะ [9] ส่วนอุณหภูมิสำหรับขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมนั้นคำนวณจาก Primer Blast ซึ่งแตกต่างกันในไพรเมอร์แต่ละคู่ [7] จากการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งสนิปส์ -1639G > A (rs9923231) และ 1173C > T (rs9934438) ของยีน *VKORC1* พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.25 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของ Betaine (Adjuvant) 5 โมลาร์ PCR Buffer และ Taq DNA Polymerase (Immulse) เหมาะสมสำหรับทุกปฏิกิริยาพีซีอาร์ ส่วนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์คู่มิวแทนท์และไพรเมอร์คู่ควบคุมที่สนิปส์ตำแหน่ง -1639G > A ในขณะที่ไพรเมอร์คู่ไวลด์ไทป์ใช้อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส ส่วนสนิปส์ตำแหน่ง 1173C > T ทุกคู่ไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส ผลผลิตพีซีอาร์ยืนยันผลด้วยวิธี Sanger DNA Sequencing แล้วเปรียบเทียบกับ Nucleotide Blast กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VKORC1* ในฐานข้อมูล NCBI : NG_011564.1 ผลการทดสอบมีความสอดคล้องกัน 100 %

การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นสำหรับพัฒนาเครื่องหมาย AS-PCR เพื่อใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *VKORC1* ซึ่งยังมีข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น ซึ่งยังไม่ครอบคลุมจีโนมไทป์ที่เป็นไปได้ทั้งหมดของสนิปส์ทั้งสองตำแหน่ง เนื่องจาก Homozygous Wildtype ของสนิปส์ -1639G > A (rs9923231) และ 1173C > T (rs9934438) เป็นจีโนมไทป์ที่พบความถี่น้อยมากในประชากรชาวไทย แผนงานวิจัยขั้นต่อไปจะพัฒนาจากวิธี Singleplex AS-PCR ซึ่งต้องแยกหลอดสำหรับไพรเมอร์แต่ละคู่ เปลี่ยนเป็น Multiplex AS-PCR ซึ่งอาจจะมีการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และอุณหภูมิสำหรับพีซีอาร์ขั้นตอน Annealing อีกครั้ง เพื่อปรับลดผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะ และให้ได้สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสม รวมทั้งการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยใช้จำนวนตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- [1] Thongarporn, S. (2012). *Prevalence of adverse drug reactions and factors affecting bleeding from warfarin usage in southern Thai patients*. Master Thesis. Prince of Songkla University.
- [2] Charuchotekamol, A. (2010). Warfarin and genetic polymorphism. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 5(2), 180–184.
- [3] Choicharnchaikul, S., Malathum, P., & Karnchanachari, S. (2008). The use of warfarin in older adults: a case study and caring. *Ramathibodi Nursing Journal*, 14(3), 366–384.
- [4] Ansell, J., Hirsh, J., Hylek, E., Jacobson, A., Crowther, M., & Palareti, G. (2008). Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: american college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition). *Chest*, 133(6 Suppl), 160S–198S. DOI: 10.1378/chest.08-0670.

- [5] Rettie, A. E., & Tai, G. (2006). The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. *Molecular Interventions*, 6(4), 223–227. DOI: 10.1124/mi.6.4.8.
- [6] Limdi, N. A., Wadelius, M., Cavallari, L., Eriksson, N., Crawford, D.C., Lee, M. M., ... Wagner, (2010). Warfarin pharmacogenetics: a single *VKORC1* polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood*, 115(18), 3827–3834. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-255992>.
- [7] Sambrook, J. F., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. (3rd Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [8] Liu, J., Huang, S., Sun, M., Liu, S., Liu, Y., Wang, W.,... Hua, W. (2012). An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, 8, 34 (2012). DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-34>.
- [9] Park, Y. H., & Kohel, R. J. (1994). Effect of concentration of $MgCl_2$ on random-amplified DNA polymorphism. *Biotechniques*, 16(4), 652–656.