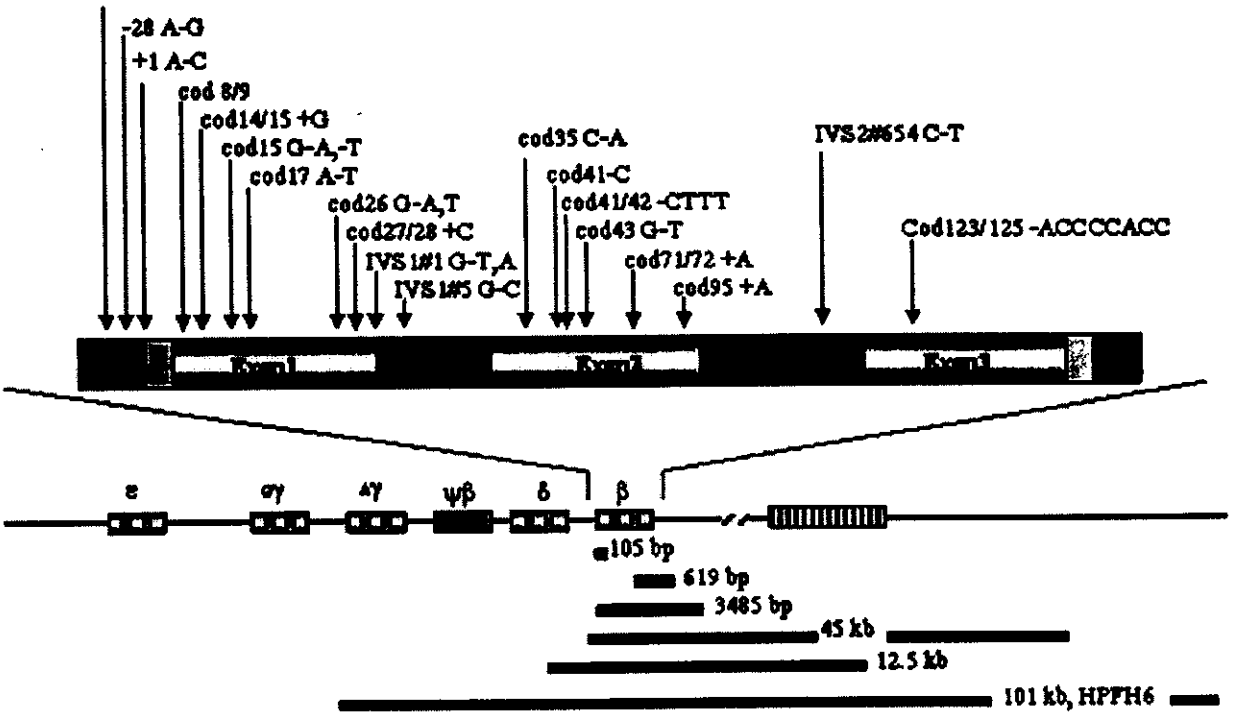
บทนำ

โรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อย และเป็นปัญหาที่สำคัญ ในประเทศไทยโรคหนึ่ง โดยเฉลี่ยประชากรไทยประมาณ 3-9% เป็นพาหะของเบตาธาลัสซีเมีย (1) เบตาธาลัสซีเมียเกิดจากการที่ร่างกายสร้างสายเบตาโกลบินของฮีโมโกลบินในปริมาณที่น้อยกว่าปรกติ หรือไม่สร้างเลย ทำให้สายโกลบินที่ไม่มีความผิดปรกติ (เช่น สายอัลฟาโกลบิน) มีปริมาณเกินดุล สายโกลบินที่เกินจะตกตะกอนภายในเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงมีความผิดปรกติ และถูกทำลายได้ง่าย เกิดเป็น hemolytic anemia ทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีด เหลือง ตับม้าม โต เจริญเติบโตช้า และมีการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มมากกว่าปรกติ เพื่อทดแทนเม็ดเลือดแดงที่แตกทำลายไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระดูก ทำให้กระดูกใบหน้าเปลี่ยนไป ขยายกว้าง ดั้งจมูกยุบ หน้าผากกว้าง มีลักษณะที่เรียกว่า "ใบหน้าธาลัสซีเมีย" และทำให้เกิดความผิดปรกติกับอวัยวะอื่นๆ ของร่างกายอีกหลายประการ (2)

ปัจจุบันพบว่าเบตาธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากมิวเตชั่น (mutation) ของโมเลกุล DNA ของยีนเบตาโกลบิน (3) ในประเทศไทยพบชนิดของมิวเตชั่นของเบตาธาลัสซีเมียแล้วมากกว่า 20 ชนิด (ตารางที่ 1) ส่วนใหญ่เป็น point mutation คือมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสจำนวนน้อย 1 ถึง 4 เบส อาจเกิดการแทนที่ หรือขาดหายหรือเพิ่มขึ้นมาบนสายดีเอ็นเอ (4-8) มีเบตาธาลัสซีเมียส่วนน้อยเกิดจากยีนเบตาโกลบินบางส่วนหรือทั้งยีนแหว่งหายไปจากโครโมโซม (8)

ตำแหน่งของ point mutation ของบีตาโกลบินยีนแสดงในไดอะแกรมที่ 1



รูปที่ 1 ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบในประเทศไทย

การตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นของเบตาธาลัสซีเมีย มีประโยชน์ในการช่วยบอกความรุนแรงของโรค (prognosis) ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (genetic counseling) แก่ผู้ที่เป็นธาลัสซีเมีย และช่วยในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ (prenatal diagnosis) และการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation)

ตารางที่ 1 ชนิดการกลายพันธุ์ และความถี่ ของยีนบีตาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทย และประเทศใกล้เคียง

ชนิดการกลายพันธุ์	ความถี่ (ร้อยละ)							
	ไทย				มาเลเซีย	พม่า	อินเดีย	จีน
	ใต้	กลาง	เหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ				
Codon 41/42 (TTCTTT->TT)	30.1	41.6	39.8	37.7	12.2	21.2	11.8	46.7
IVS 1#5 (G->C)	18.8	4.3	2.8	0	48.8	27.2	22.5	1.9
Codon 19 (AAC-AGC)	15.2	2.9	ND	0	14.6	0	0	0
Codon 17 (AAG->TAG)	11.3	16.5	39.8	29.5	2.4	7.1	0	17.6
IVS1#1 (G->T)	6.0	1.3	ND	1.6	7.3	34.3	13.7	0.5
-28 (A->G)	5.7	9.3	3.5	1.6	0	4.0	0	11.1
3.5 kb deletion	4.3	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IVS2#654 (C->T)	2.1	8.0	1.4	9.8	7.3	2.0	0	13.9
Codon 41 (-C)	1.4	0.8	ND	0	0	0	0	0
Codon 8/9 (AGTCT->AGGTCT)	0.4	0	0	0	0	0	19.6	0
105 bp deletion	0.4	0	0	0	0	0	0	0
codon 15 (TGG->TAG)	0.4	0	0	0	0	0	4.9	0
CAP site (A->C)	0.4	0	0	0	0	0	2.0	0
IVS1#1 (G->A)	0.4	0	0	0	0	0	0	0
-88 (C-T)	0	0	0	0	0	0	2.0	0
-86 (C-G)	0	0.5	0	0	0	0	0	0
Cod 16 (-C)	0	0	0	0	0	0	1.0	0
Cod 35 (C->A)	0	2.7	0	0	0	0	0	0
Cod 35 (-C)	0	0	0	0	4.8	0	0	0
Cod 71/72 (+A)	0	2.1	0	13.1	0	0	0	7.4
Cod 26 (G-T)	0	ND	0	1.6	0	0	0	0
619 bp deletion	0	1.1	0	0	0	0	20.5	0
Cod 43 (G-T)	0	0.8	0	0	0	0	0	0

Cod 15 (-T)	0	0.3	0	0	0	0	0	0
Cod 14/15(+G)	0	0.3	0	0	0	0	0	0
uncharacterized	3.1	5.1	13.3	4.9	2.4	4.1	2.0	0.5
จำนวนอัลลีลที่ศึกษา	282	375	113	61	41	99	102	216

ND = not determined

การตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นของเบตาธาลัสซีเมีย ต้องอาศัยเทคนิคทาง molecular biology ในอดีตจะต้องทำ hybridization ของ genomic DNA กับตัวตรวจสอบชนิดของมิวเตชั่นที่จำเพาะ [allele specific oligonucleotide (ASO) probes] ซึ่งมีวิธีการยุ่งยากเพราะจะต้องย่อย DNA ด้วย restriction enzyme และ run gel electrophoresis แล้วจึงทำ hybridization (5, 9) ข้อเสียของวิธีดังกล่าวคือต้องใช้ DNA ของผู้ป่วยจำนวนมาก ใช้เวลานาน และจะต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ^{32}P ต่อมาปี ค.ศ.1985 Saiki และคณะค้นพบเทคนิคการเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลองโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ polymerase enzyme (10) ทำให้สามารถตรวจหาชนิดของมิวเตชั่น ของยีนเบตาธาลัสซีเมียได้โดยการทำ dot blot hybridization กับ ASO probes ชนิดต่าง ๆ (11,12) หรือทำ allele specific PCR (13) หรือทำ PCR แล้วย่อยด้วย restriction emzymes (14) เป็นต้น อย่างไรก็ดี วิธีการเหล่านี้ เป็นการตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นคราวละชนิดเพราะจะต้องใช้ probe ที่จำเพาะหรือใช้ allele specific-PCR primer คราวละ 1 คู่ ทำให้เสียเวลา ในการสุ่มหาชนิดของเบตาธาลัสซีเมีย และเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค ASO probe hybridization ที่เรียกว่า reverse dot blot analysis ซึ่งช่วยให้ตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นของยีนธาลัสซีเมียได้คราวละหลายชนิด (15) หลักการของเทคนิคนี้ คือ การสร้าง ASO probes หลายๆ ชนิดที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) นำมายึดติดบนแผ่นไนลอนเมมเบรนที่เป็นประจุลบแล้วนำ DNA ของผู้ป่วยที่ได้ทำ PCR โดยมีนิวคลิโอทัยด์บนสาย DNA ติดสลากอยู่กับ biotin มา hybridize กับ ASO probes บนแผ่นเมมเบรนดังกล่าว แล้วจึงตรวจสอบปฏิกริยา hybridization ระหว่าง ASO probe กับ DNA ของผู้ป่วยโดยการทำ enzymatic color detection วิธีการดังกล่าวจะทำให้สามารถทราบชนิดของมิวเตชั่นของยีนได้โดยการทำ hybridization เพียงครั้งเดียว เพราะเป็นการนำ DNA ของผู้ป่วยมา hybridize กับ ASO probes หลาย ๆ ชนิดที่ยึดติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนแผ่นเดียวกัน วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว สำหรับตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นของยีนธาลัสซีเมีย และเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาความผิดปรกติของยีนในทารกก่อนคลอด ในคู่สมรสที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย

เนื่องจากวิธี Reverse dot blot analysis ที่ได้พัฒนามาใช้ในปัจจุบัน ต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงไม่สะดวก ในการนำไปใช้ในการตรวจประจำวันเพื่อวินิจฉัยผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การวิจัยครั้งนี้ได้หาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจมิวเตชั่นของยีนบีตาธาลัสซีเมียที่พบได้บ่อยในประเทศไทย จำนวน 17 ชนิด
2. เพื่อออกแบบอุปกรณ์และเตรียมชุดน้ำยาสำหรับตรวจมิวเตชันของยีนบีตาธาลัสซีเมีย
3. เพื่อทดสอบความคงทนของชุดน้ำยา และวิธีการเก็บรักษา
4. เพื่อจดสิทธิบัตรชื่อชุดน้ำยา ส่วนประกอบ และวิธีการตรวจ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตชุดน้ำยาที่มีคุณภาพและราคาถูก สำหรับการตรวจมิวเตชั่นของบีตาธาลัสซีเมียให้แก่โรงพยาบาลศูนย์ และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ภายในประเทศได้

2. ถ้ามหาวิทยาลัยมีองค์กรที่สนับสนุน สามารถขยายการผลิตสู่ตลาดต่างประเทศได้ โดยเฉพาะประเทศในเอเชียและยุโรป ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีอุบัติการของโรคธาลัสซีเมียสูง

3. จดสิทธิบัติชุดน้ำยาสำหรับตรวจมิวเตชันของบีตาธาลัสซีเมีย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. หลักการของวิธีทดสอบ (Principle of the test)

เทคนิค reverse dot blot hybridization จะช่วยให้ตรวจหาชนิดมิวเตชั่นของบีตาธาลัสซีเมียได้รวดเร็ว โดยสามารถตรวจได้หลายชนิดในการทดสอบครั้งเดียว หลักการของเทคนิคนี้คือ การสร้าง ASO probes ที่จำเพาะสำหรับมิวเตชั่นหลายชนิด โดยสร้างให้มีปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) แล้วนำมายึดติดบนแผ่นไนลอนเมมเบรนชนิดประจุลบ (มี COO^-) แล้วนำไป hybridize กับ DNA ของผู้ป่วยที่ได้ทำ PCR โดยใช้ primers ที่มี biotin ติดอยู่ แล้วตรวจสอบปฏิกริยา hybridization ระหว่าง ASO probe กับ DNA ของผู้ป่วยโดยวิธี enzymatic colormetric reaction โดยวิธีดังกล่าวจะสามารถตรวชนิดของมิวเตชั่นของยีนได้โดยการทำ hybridization เพียงครั้งเดียว เพราะเป็นการนำ DNA ของผู้ป่วยมา hybridize กับ ASO probes หลายๆชนิดที่ยึดติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนแผ่นเดียวกัน วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว สำหรับตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นของยีนธาลัสซีเมีย และเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาความผิดปรกติของยีนในทารกก่อนคลอด ในคู่สมรสที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย

2. การเตรียมตัวอย่าง (Simple preparation)

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เตรียมได้จาก DNA ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียในคนไทยที่ทราบชนิดของมิวเตชั่นแล้วโดยวิธีตรวจมาตรฐานคือ standard reverse dot blot hybridization จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้ จำนวนประมาณ 30 ราย ให้ครอบคลุมทั้ง 17 มิวเตชั่น

นำตัวอย่าง DNA มาเพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบิน โดยใช้ primer 2 ชุด คือ

ชุดที่ 1 เพิ่มปริมาณในช่วง promoter ถึงส่วนต้นของ intron 2

ชุดที่ 2 เพิ่มปริมาณในช่วง intron 2 (รวม IVS2#654)

Primers ที่ใช้คือ RDB1 : Biotin-5'-AACTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGA-3'

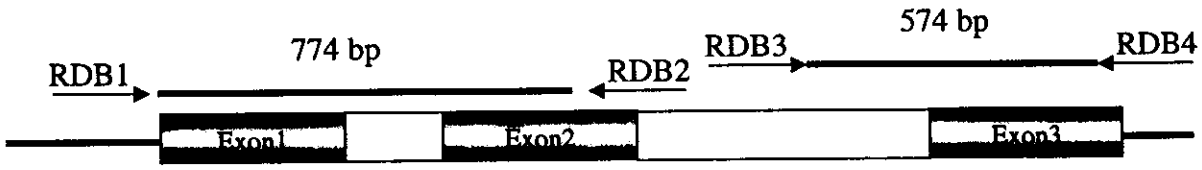
RDB2 : Biotin-5'-TCATTCGTCTGTTTCCCATTCTAAAC-3'

RDB3 : Biotin-5'-TATCATGCCTCTTTGCACCATTCT-3'

RDB4 : Biotin-5'-CACTGACCTCCCACATTCCCTTTT-3'

โดยในแต่ละชุดมี primer ตัวใดตัวหนึ่งติดฉลากด้วย biotin

ตำแหน่ง primers ทั้ง 4 ตัว และขนาด PCR products แสดงในไดอะแกรมรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของ primers RDB1, RDB2, RDB3 และ RDB4 บนบีตาโกลบินยีน และแสดงขนาดของ PCR ที่เกิดจาก primers ทั้ง 2 ชุด คือ ขนาด 774 เบส จาก primers RDB1 และ RDB2 และ 574 เบส จาก primers RDB3 และ RDB4

รูปที่ 3 ภาพถ่ายเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) ของบริษัทไบโอแรด ที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3. วิธีทดสอบ (Detection)

1) <u>เตรียม ASO-probe strips</u>

สร้าง NH_2 labeled ASO-probe โดยมีลำดับเบสแสดงในตารางที่ 2 และมีหมู่อะมิโน (NH_2) ติดอยู่ที่ปลาย 5'ASO probes ควรมีจำนวนนิวคลิโอทัยด์ 17-19 เบส เพื่อให้มี Tm ประมาณ 48-54°C นำ ASO probes มาติดบนไนลอนเมมเบรนที่มีประจุลบ (Biodyne C nylon membrane) โดย activate carboxyl group บนเมมเบรนด้วย 16% 1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl (EDC, sigma E 7750) นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้งสนิทบนกระดาษ 3 M (ทิ้งไว้ไม่ให้เกิน 30 นาที)

ละลาย ASO probes ใน 0.5 M sodium bicarbonate buffer, pH 8.4 ให้มีความเข้มข้นประมาณ 2-5 pmol/µl ดูดมา 1.5 µl ด้วย micropipet แล้วหยดลงบนแผ่นเมมเบรนให้ตรงตามตำแหน่งมิวเตชั่นที่ทำเครื่องหมายไว้ก่อนแล้ว ทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 15 นาที แล้วแช่ใน 0.1 M NaOH นาน 5-10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อ neutralize เมมเบรน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง ก่อนเก็บในถุงพลาสติกที่กันความชื้น

ตารางที่ 2 ลำดับเบสและคุณสมบัติของ ASO- probes

Name	SEQUENCE (5' --> 3')	Length	%CG	Tm	จำนวนเบส				Mutation
					A	G	C	T	
R1 N	CAGAGGTTCTTTGAGTCC	18	64.5	54	3	5	4	6	COD41/42 (-TCTT)
R1 M	CAAAGGACTCAACCTCTGG	19	67.5	58	6	4	6	3	COD41/42 (-TCTT)
R2 M	CCAGAGGTTCTTTTAGTC	18	62.2	52	3	4	4	7	COD43 (G-T)
R3 M	CCAGAGGTTTTTGAGTCC	18	64.5	54	3	5	4	6	COD41 (-C)
R4 N	GTGGGGCAAGGTGAAC	16	64.9	52	4	8	2	2	COD17 (A-T)
R4M	GTGGGGCTAGGTGAAC	16	64.9	52	3	8	2	3	COD17 (A-T)
R5 M	TTCATCCACGCTCACCTT	18	64.5	54	3	1	8	6	COD19 (A-G)
R6 N	ATACCAACCTGCCCAG	16	62.3	50	4	2	7	3	IVS1#1 (G-T)

R6 M	CTGGGCAGTTTGGTAT	16	59.8	48	2	6	2	6	IVS1#1 (G-T)
R7 N	CCTTGATACCAACCTGC	17	63.5	52	4	2	7	4	IVS1#5 (G-C)
R7 M	GCAGGTTGCTATCAAG	16	59.8	48	4	5	3	4	IVS1#5 (G-C)
R8 N	AGGAGAAGTCTGCCGTT	17	63.5	52	4	6	3	4	COD8/9 (+G)
R8 M	CGGCAGACCTTCTCCT	16	64.9	52	2	3	7	4	COD8/9 (+G)
R9 N	CAGGGCCTCACCACCA	16	67.5	54	4	3	8	1	COD26 (G-A)
R9 M	TTGGTGGTAAGGCCCT	16	62.4	50	2	6	3	5	COD26 (G-A)
R10 M	GGTGAGGCCCCTGG	14	65.5	50	1	7	4	2	COD27/28 (+C)
R11 N	CCTGTGGGGCAAGGTGA	17	68.3	56	3	8	3	3	COD15 (G-A)
R11 M	CCCTGTAGGGCAAGGTG	17	68.3	56	3	7	4	3	COD15 (G-A)
R12 N	TCGGTGCCTTTAGTGAT	17	61.1	50	2	5	3	7	COD71/72 (+A)
R12 M	GGTGCCTTTAAGTGATG	17	61.1	50	3	6	2	6	COD71/72 (+A)
R13 N	GGTGGTCTACCCTTGGA	17	65.9	54	2	6	4	5	COD35 (C-A)
R13 M	TCCAAGGTTAGACCACC	17	63.5	52	5	3	6	3	COD35 (C-A)
R14 N	GGGTTAAGGCAATAGCAAT	19	63.2	54	7	6	2	4	IVS2#654 (C-T)
R14 M	ATTGCTATTACCTTAACCC	19	61.1	52	5	1	6	7	IVS2#654 (C-T)
R15 N	GGGCATAAAAGTCAGGG	17	63.5	52	6	7	2	~~2~~	-28 (A-G)
R15 M	CCCTGACTTCTATGCCC	17	65.9	54	2	2	8	5	-28 (A-G)
R16 M	CCCTGACTTTCATGCCC	17	65.9	54	2	2	8	5	-29 (A-G)
R17 M	CCTGACTTTTGTGCCC	16	62.4	50	1	3	6	6	-30 (T-C)
R18 M	AGGGCCTAACCACCAA	16	62.4	50	1	6	3	6	COD26 (G-T)
R19 N	GACAAGCTGCACGTGGA	17	65.9	54	5	6	4	2	COD95 (+A)
R19 M	TGCAGCTTTGTCACAGTG	18	62.2	52	3	5	3	7	COD95 (+A)
R20 N	TGCACTGGTGGGGTGAA	17	65.9	54	4	2	8	3	COD123-125(-ACCCCACC)
R20 M	GAATTCAGTGCAGGCTG	17	63.5	52	4	6	3	4	COD123-125 (-ACCCCACC)
R21 M	CTGGGCAGATTGGTAT	16	59.8	48	3	6	2	5	IVS1#1 (G-A)
R22 M	ATACCAACTTGCCCAGG	17	63.5	52	5	3	6	3	COD30 (AGG-AAG)
R23 N	CCTGTGGGGCAAGGTGA	17	68.3	56	3	8	3	3	COD14-15 (+G)
R23 M	CCCTGGTGGGGCAAGG	16	70.1	56	2	8	4	2	COD14-15 (+G)
R24 M	TGCCCTGGGGGCAAGG	16	70.1	56	2	8	4	2	COD15 (-T)
R25 M	CAGCCTGCCCTGGTGG	16	70.1	56	3	6	6	1	COD126 (GTG-GGG)
R26 N	GCCACACCCTAGGGTT	16	64.9	52	3	4	6	3	-86 (C-G)
R26 M	AACCCTACGGTGTGGC	16	64.9	52	3	5	5	3	-86 (C-G)
R27 N	CATCTATTGCTTACATTTG	19	58.9	50	4	2	4	9	CAP Site
R27 M	AAATGGAAGCAATAGATGG	19	61.1	52	9	6	1	3	CAP Site
R28 N	GCATAAAAGTCAGGGCAG	18	64.5	54	7	6	3	2	105 bp Del

R28 M	GCATAAAAGCCGTTACTG	18	62.2	52	6	4	4	4	105 BP DEL
R29 N	TGACTCCTGAGGAGAAGT	18	64.5	54	5	6	3	4	COD6 HBC
R29 M	GCAGACTTCTCCTTAGG	17	63.5	52	3	4	5	5	COD6 HBC(G-A)

2) Hybridization นำ PCR มาทำปฏิกิริยากับ ASO- probe strip โดยมีขั้นตอนดังนี้

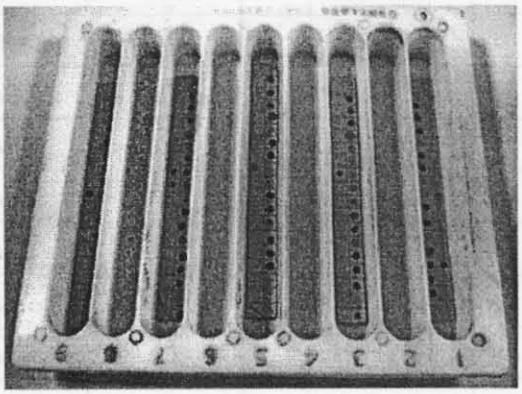
2.1 Prehybridization โดยแช่แผ่นเมมเบรนใน Hybridization buffer (2xSSC/0.1% SDS) 2 ml ใน plastic tray ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 4)

2.2 Denature PCR โดยผสมกับ 40 µl denature solution ประมาณ 3-5 นาที แล้วดูดใส่ plastic tray ที่มี prehybridized membrane

2.3 Incubate บน shaker ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

2.4 ล้างเมมเบรนด้วย washing solution (2xSSC/0.1% SDS) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้งๆละ 5 นาที

2.5 Enzymatic Detection เนื่องจาก PCR มี biotin ติดอยู่ทำให้สามารถตรวจสอบผล hybridization ได้โดยใช้ enzymatic reaction โดยนำ hybridized strip มา incubate กับ 1:1000 streptavidine alkaline phosphatase ในสารละลาย 2xSSC/0.1%SDS เขย่านาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 2xSSC/0.1% SDS 1 ครั้ง 5 นาที และล้างใน Detection buffer (100 mM tris pH 9.5, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl) นาน 5 นาที เติม substrate NBT/BCIP ที่ละลายใน 10 ml Detection buffer ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ผลบวกจะเกิดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้ม เปรียบเทียบผลกับ standard reverse dot blot hybridization



รูปที่ 4 การทำปฏิกิริยา hybridization โดยนำ ASO-probe strip ใส่ใน plastic tray

3. **การเตรียมชุดน้ำยา**

ส่วนประกอบของชุดน้ำยา (Kit components) ชุดน้ำยา 1 ชุดจะประกอบด้วยน้ำยาที่สามารถตรวจได้ 10 ราย โดยมีส่วนประกอบดังนี้ Denature solution, ASO-probe strip ตรวจได้ 17 mutations และสามารถอ่านผลได้เป็น normal หรือ heterozygote หรือ homozygote, Hybridization buffer, Washing solution, Blocking solution, Detection buffer, Enzymatic substrate, และ Incubation tray (Plastic tray)

4. **ทดสอบความคงทนของชุดน้ำยา** โดยนำชุดน้ำยาที่เตรียมได้ในข้อ 3 มาทดสอบเปรียบเทียบผลในระยะเวลาการเก็บ 1 เดือน 3 เดือน 6 เดือน และ 1 ปี โดยทำการทดสอบควบคู่กับวิธี standard reverse dot blot hybridization

ผลการวิจัย

1. **ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ** เตรียมได้จาก DNA ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียในคนไทยที่ทราบชนิดของมิวเตชั่นแล้วตามตารางที่ 1 โดยวิธีตรวจมาตรฐานคือ standard reverse dot blot hybridization จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้ จำนวนประมาณ 100 ราย ให้ครอบคลุมทั้ง 17 มิวเตชั่น ผลการตรวจแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของตัวอย่างบีตาธาลัสซีเมีย

Patient's Code	Sex	Age	Typing	%A2	Mutation	Diagnosis
1985	F	26	AA2	5.5	I 1#5 / N	Beta trait
1987	F	17	AA2	5.4	cod 17 / N	Beta trait
2033	F	32	AA2	7.7	cod 17 / N	Beta trait
2037	F	21	AA2	5.1	cod 17 / N	Beta trait
2118	F	26	AFA2	3.9	cod 19 / N	Beta trait
2129	F	36	AA2	4.8	4 bp / N	Beta trait
2168	M	33	AA2	6.2	3.5 kb / N	Beta trait
2201	M	26	AA2	5.7	-28 / N	Beta trait
2203	F	21	AA2	6.1	-28 / N	Beta trait
2206	F	9	AA2	5.7	-28 / N	Beta trait
2212	F	27	AA2	5.2	4bp / N	Beta trait
2233	F	24	AA2	5.7	cod 17 / N	Beta trait
2284	M	26	AA2	5.5	I 2#654 / N	Beta trait
2315	M	35	AA2	6.1	4 bp / N	Beta trait
2321	F	19	AA2	5.8	cod 19 / N	Beta trait
2332	M	59	AA2	4.7	cod 19 / N	Beta trait
2334	F	30	AA2	4.3	I 1#5 / N	Beta trait
2359	M	30	AA2	6	4 bp / N	Beta trait
2376	F	25	AA2	4.8	I 1#5 / N	Beta trait
2466	M	33	AA2	5.2	I 1#5 / N	Beta trait
2477	F	31	AA2	5.3	I 1#1 / N	Beta trait
2481	F	35	AA2	4.2	4 bp / N	Beta trait

2500	M	28	AA2	6.2	3.5 kb / N	Beta trait
2508	F	28	AA2	4.5	I 1#5 / N	Beta trait
2509	M	30	AA2	5.7	4 bp / N	Beta trait
2510	F	1	AFA2	5.6	3.5 kb / N	Beta trait
2514	F	30	AA2	5.6	-28 / N	Beta trait
2529	F	65	AA2	3.7	I 1#5 / N	Beta trait
2535	F	29	AA2	5.1	3.5 kb / N	Beta trait
2555	M	91	AA2	4.6	4 bp / N	Beta trait
2560	M	34	AA2	5.3	cod 19 / N	Beta trait
2577	F	19	AA2	5	cod 19 / N	Beta trait
2593	F	28	AA2	3.8	cod 19 / N	Beta trait
2595	F	32	AA2	5.4	4 bp / N	Beta trait
2596	M	32	AA2	4.9	4 bp / N	Beta trait
2600	F	31	AA2	4.3	4 bp / N	Beta trait
Code	Sex	Age	Typing	%A2	Mutation	Diagnosis
1980	M	7	FE	41.5	3.5 kb / HbE	Beta/HbE
1993	M	23	AFE	18	-28 / HbE	Beta/HbE
2041	M	31	AFE	50.7	-28 / HbE	Beta/HbE
2135	F	4	FE	46.6	I 2#654 / HbE	Beta/HbE
2137	F	29	FE	46.4	4bp / HbE	Beta/HbE
2138	F	14	FE	43.1	I 2#654 / HbE	Beta/HbE
2171	F	11	FE	34.9	I 1#1 / HbE	Beta/HbE
2172	M	6	FE	61.1	4 bp / HbE	Beta/HbE
2317	M	22	AE	34.2	HbE/N	HbE trait
2587	F	30	AE	32.3	HbE/N	HbE trait
2592	F	26	AE	30.5	HbE/N	HbE trait
2612	M	35	AE	30.4	HbE/N	HbE trait
2617	M	24	AE	31.6	HbE/N	HbE trait
2623	M	25	AE	31.85	HbE/N	HbE trait
2043	F	29	EE	100	HbE/HbE	Homo E
2134	M	12	EE	100	HbE/HbE	Homo E
2338	F	35	EE	100	HbE/HbE	Homo E
2341	F	18	EE	100	HbE/HbE	Homo E
2421	F	42	EE	100	HbE/HbE	Homo E
2423	M	84	EE	100	HbE/HbE	Homo E
2432	F	37	EE	100	HbE/HbE	Homo E
2486	F	7	EE	100	HbE/HbE	Homo E

2589	F	27	EE	100	HbE/HbE	Homo E
2740	F	12	AFA2	2.3	4 bp/cod 19	Major
7999	F	11	AFA2	1.7	cod19/I 1#5	Major

2. การออกแบบและสังสร้าง ASO primers และ ASO probes ที่ใช้ในการทำ PCR และ reverse dot blot hybridization การออกแบบ oligonucleotide ได้ใช้โปรแกรม Oligo version 6.65 ของบริษัท Molecular Biology Insights, USA ช่วยในการหาตำแหน่งที่จำเพาะ และวิเคราะห์คุณสมบัติที่เหมาะสม สั่งสร้างจากบริษัทธีระและบริษัทกิปไทย

ปฏิกิริยาพีซีอาร์

PCR mixture ปริมาตรรวม 50 µl

DNA	200	ng
10xbuffer	5	µl
25 mM $MgCl_2$	3	µl
RDB1 (10 pmol/µl)	2	µl
RDB2 (10 pmol/µl)	2	µl
RDB3 (10 pmol/µl)	2	µl
RDB4 (10 pmol/µl)	2	µl
1.25 mM dNTPs	8	µl
5 U/ µl *Taq* DNA Polymersase	0.25	µl

เติมน้ำให้มีปริมาตร 50 µl

PCR condition

รอบที่ 1	95°C	5 นาที
รอบที่ 2-30	94°C	45 วินาที
	58°C	45 วินาที
	72°C	60 วินาที
รอบที่ 31	94°C	60 วินาที
	55°C	15 วินาที
	72°C	5 นาที

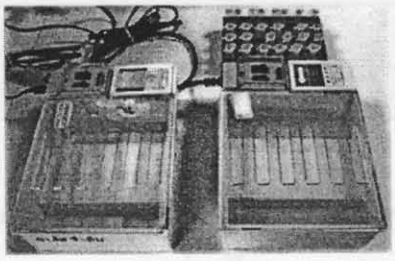
ผลจากการทำ multiplex PCR โดยใช้ primers 2 ชุด

Primers ที่ใช้คือ RDB1 : Biotin-5'-AACTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGA-3'

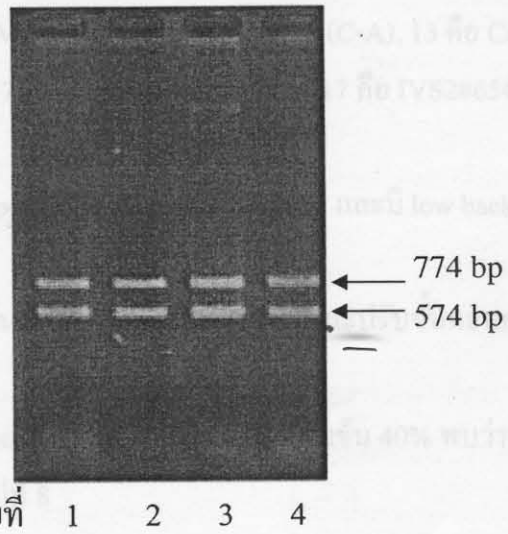
RDB2 : Biotin-5'-TCATTCGTCTGTTTCCCATTCTAAAC-3'

RDB3 : Biotin-5'-TATCATGCCTCTTTGCACCATTCT-3'

RDB4 : Biotin-5'-CACTGACCTCCCACATTCCCTTTT-3'



รูปที่ 5 แสดงเครื่องมือที่ใช้ทำ Agarose gel electrophoresis



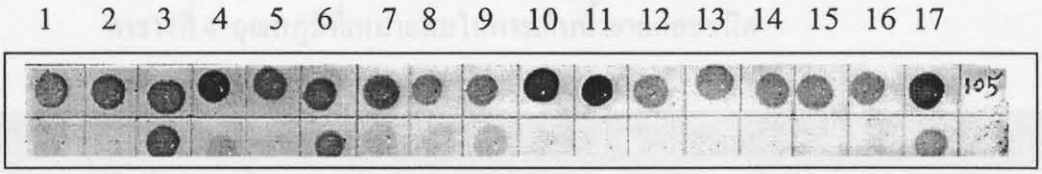
รูปที่ 6 แสดงผลพีซีอาร์ของ primers RDB1, RDB2, RDB3 และ RDB4 หลังจากทำ agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide ขนาดของ PCR ที่เกิดจาก primers ทั้ง 2 ชุด คือ ขนาด 774 เบส จาก primers RDB1 และ RDB2 และ 574 เบส จาก primers RDB3 และ RDB4

พบว่าให้ผลที่มีความจำเพาะสูงและปริมาณที่เพียงพอสำหรับนำไปวิเคราะห์หา mutation ต่อโดยวิธี reverse dot blot hybridization

3. **ผลการทำ reverse dot blot hybridization**

ผลจากการทดลองทำ reverse dot blot hybridization โดยนำ PCR products ของผู้ป่วยที่ตรวจพบ β-thalassemia mutations ชนิดต่างๆ โดยวิธีมาตรฐาน มา hybridized กับ oligonucleotide probes สำหรับ 17 mutations ที่ยึดติดบน nylon membrane

ตัวอย่างผลการทดลองจาก PCR-DNA ของผู้ป่วยที่มี mutation ตำแหน่งที่ 3 กับตำแหน่งที่ 6 แสดงในรูปที่

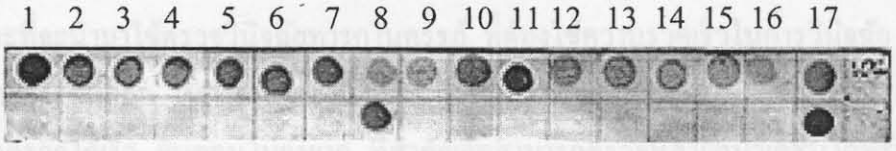


รูปที่ 7 แสดงภาพถ่ายจากผล reverse dot blot strips ในแต่ละ strip มี probes ที่จำเพาะสำหรับ mutations ต่างๆ 17 ชนิด โดยแถวบนเป็น normal probe และแถวล่างเป็น mutant probe ของ mutation ชนิดนั้นๆ จากรูปเป็นผลจากดีเอ็นเอผู้ป่วยที่เป็น mutation ที่ตำแหน่ง 3 และ 6 [ตำแหน่งที่ 1 คือ -30(T-C), 2 คือ -28(A-G), 3 คือ -29(A-G), 4 คือ cod 8-9(+G), 5 คือ cod 15(G-A), 6 คือ cod 17(A-T), 7 คือ cod 19(A-G), 8 คือ cod 26(G-A), 9 คือ cod 27-28(+C), 10 คือ IVS1#1 (G-T), 11 คือ IVS1#5 (G-C), 12 คือ cod 35 (C-A), 13 คือ Cod 41(-C), 14 คือ cod 41-42 (-TCTT), 15 คือ cod 43 (G-T), 16 คือ cod 71-72 (+A), และตำแหน่งที่ 17 คือ IVS2#654 (C-T)]

จากผลการทดลอง พบว่า มี non-specific binding ที่ตำแหน่ง 17 และมี low background ที่ตำแหน่ง 4, 7, 8 และ 9

แนวทางแก้ไขคือ ปรับความเข้มข้นของ probes ให้เหมาะสม และปรับขั้นตอนการล้างด้วย washing solution ให้เหมาะสม

ผู้วิจัยได้ปรับขั้นตอน hybridization โดยเติมสาร formamide เข้มข้น 40% พบว่าสามารถลด non-specific binding และ background ได้ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงภาพถ่ายจากผล reverse dot blot strips ในแต่ละ strip มี probes ที่จำเพาะสำหรับ mutations ต่างๆ 17 ชนิด โดยแถวบนเป็น normal probe และแถวล่างเป็น mutant probe ของ mutation ชนิดนั้นๆ จากรูปเป็นผลจากดีเอ็นเอผู้ป่วยที่เป็น mutation ที่ตำแหน่ง 8 และ 17 [ตำแหน่งที่ 1 คือ -30(T-C), 2 คือ -28(A-G), 3 คือ -29(A-G), 4 คือ cod 8-9(+G), 5 คือ cod 15(G-A), 6 คือ cod 17(A-T), 7 คือ cod 19(A-G), 8 คือ cod 26(G-A), 9 คือ cod 27-28(+C), 10 คือ IVS1#1 (G-T), 11 คือ IVS1#5 (G-C), 12 คือ cod 35 (C-A), 13 คือ Cod 41(-C), 14 คือ cod 41-42 (-TCTT), 15 คือ cod 43 (G-T), 16 คือ cod 71-72 (+A), และตำแหน่งที่ 17 คือ IVS2#654 (C-T)]

4. ทดสอบความคงทนของชุดน้ำยา

โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20°C และ 4°C ในระยะเวลาต่างๆ พบว่าสามารถเก็บชุดน้ำยาได้อย่างน้อย 1 ปี โดยให้ผลการทดสอบเหมือนเดิม อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บน้ำยาแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บน้ำยาแต่ละชนิด

ชนิดน้ำยา	เก็บที่อุณภูมิ (°C)	หมายเหตุ
ASO-probe strip	อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25-30 °C	
Denature solution	เก็บที่ 4 °C ไม่เกิน 7 วัน	ใช้วิธีต้มในน้ำเดือด 5 นาทีแทนการใช้ Denature solution
Hybridization buffer	เก็บที่ 4 °C	
Washing solution	อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25-30 °C	
Blocking solution	เก็บที่ 4 °C	
Detection buffer	อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25-30 °C	
Enzymatic substrate	เก็บที่ 4 °C	

ข้อวิจารณ์และข้อเสนอแนะ

เนื่องจากมิวเตชั่นของบีตาธาลัสซีเมียมีหลายชนิด ทั่วโลกมีรายงานแล้วเกือบ 200 ชนิด และในประเทศไทยพบแล้วประมาณ 20 ชนิด ชนิดและความถี่ของมิวเตชั่นในแต่ละภาคของประเทศพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะในภาคใต้จะมีความแตกต่างจากภาคอื่นอย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากในภาคใต้มีประชากรหลายเชื้อชาติอาศัยอยู่ร่วมกัน ถ้าตรวจด้วยวิธีดั้งเดิม ทำให้การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอมีความยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานาน ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ที่ต้องใช้ความรวดเร็วในการวินิจฉัย และต้องสามารถวินิจฉัยได้ตั้งแต่อายุครรภ์น้อยๆ ในการวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจหามิวเตชั่น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยได้พัฒนาวิธีที่สามารถตรวจได้เร็ว ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ที่สำคัญคือสามารถตรวจหลายๆมิวเตชั่นได้พร้อมๆกัน เป็นการพัฒนาจากวิธี dot blot hybridization ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไปในการตรวจหามิวเตชั่น แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถตรวจได้หลายมิวเตชั่นในปฏิกิริยาเดียวกัน ต้องแยกตรวจทีละมิวเตชั่น ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย ถ้านำมาตรวจโรคที่เกิดจากมิวเตชั่นหลายชนิดอย่างบีตาธาลัสซีเมีย

การตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นของบีตาธาลัสซีเมียมีประโยชน์สำคัญ 2 ประการคือ

1) ช่วยบอกความรุนแรงของโรค (prognosis) ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (genetic counseling) แก่ผู้ที่เป็นธาลัสซีเมีย ทั้งนี้พบว่าระดับความรุนแรงของโรคบีตาธาลัสซีเมียขึ้นอยู่กับชนิดมิวเตชั่น เช่น ถ้ามีมิวเตชั่นบริเวณโปรโมเตอร์จะมีอาการรุนแรงน้อยกว่ามิวเตชั่นบริเวณอื่นๆของยีน เป็นต้น
2) ช่วยในการควบคุมและป้องกันโรค โดยการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ (prenatal diagnosis) และยุติการตั้งครรภ์ถ้าพบว่าเป็นโรคชนิดที่มีอาการรุนแรง

การตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นของบีตาธาลัสซีเมีย ต้องอาศัยเทคนิคทาง molecular biology ในปี ค.ศ. 1985 Saiki และคณะค้นพบเทคนิคการเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลอง โดยอาศัยปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ polymerase enzyme (10) ทำให้สามารถพัฒนาวิธีตรวจมิวเตชั่นของยีนบีตาธาลัสซีเมียได้รวดเร็ว ตัวอย่างเช่น การทำ ASO-probe hybridization (11, 12) หรือทำ allele-specific PCR (13) หรือทำ PCR แล้วย่อยด้วย restriction emzyme (14) เป็นต้น จากวิธีดังกล่าวทำให้สามารถนำมาประยุกต์ ใช้ตรวจตัวอย่างจากทารกในครรภ์ตั้งแต่อายุครรภ์น้อยๆได้

แต่วิธีการดังกล่าวข้างต้นไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจหามิวเตชั่นที่มีหลายชนิดอย่างบีตาธาลัสซีเมีย เพราะเป็นวิธีที่ใช้ตรวจมิวเตชั่นได้ครั้งละชนิด ทำให้เสียเวลาและเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นในการสุ่มหามิวเตชั่น จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค reverse dot blot hybridization ขึ้น ด้วยวิธีการนี้ทำให้สามารถตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นได้หลายชนิดในการทดสอบครั้งเดียว (15-18) หลักการของเทคนิคนี้ คือ การใช้ ASO probes หลายๆ ชนิดที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) นำมายึดติดบนแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีประจุเป็นลบ แล้วนำ DNA ของผู้ป่วยมาทำ PCR โดยให้ PCR productมี biotin ติดอยู่ แล้วนำมา hybridize กับ ASO probes ที่ติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนดังกล่าว เสร็จแล้วตรวจสอบปฏิกิริยา hybridization โดยใช้ enzymatic-colorimetric reaction ด้วยวิธีการดังกล่าวจะทำให้สามารถทราบชนิดของมิวเตชั่นได้โดยการทำ hybridization เพียงครั้งเดียว ทั้งนี้เพราะสามารถนำ ASO probes หลายๆชนิดมายึดติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนแผ่นเดียวกัน วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว เหมาะสำหรับตรวจหาชนิดของมิวเตชั่นของยีนธาลัสซีเมีย และเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาความผิดปรกติของยีนในทารกในครรภ์ในคู่สมรสที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย

ข้อแตกต่างระหว่างวิธีมาตรฐาน dot blot hybridization และ reverse dot blot hybridization คือ วิธี reverse dot blot hybridization จะใช้ oligoprobe มาคอทเรียงบนแผ่นไนลอนที่มีประจุเป็นลบจาก carboxyl groupโดยโพรบแต่ละตัวจะติดฉลากด้วย amino group (NH_2) ซึ่งมีประจุเป็นบวก โพรบ 1 ตัวจะมีความจำเพาะต่อ 1 มิวเตชั่น ดังนั้นทำให้สามารถตรวจชนิดมิวเตชั่นหลายชนิดไปพร้อมๆกัน จากการวิจัยนี้สามารถตรวจได้ 17 มิวเตชั่นในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งจะครอบคลุม point mutation ทั้งหมดที่มีรายงานแล้วในภาคใต้ของประเทศ นอกจากนี้การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจผลของ hybridization โดยใช้ biotin-avidin reaction และ enzymatic color development ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สารกำมันตรังสี ทำให้สามารถนำมาใช้ได้ในการตรวจประจำวัน โดยไม่ต้องแยกห้องตรวจจากการทดสอบทั่วไป การเตรียม PCR product โดยติดฉลาก biotin กับ primer (biotinylated primer) ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและขั้นตอนในการทดสอบ ผลที่ได้มีประสิทธิภาพเหมือนกับการใช้ biotin-labelled dCTP

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการพัฒนาวิธี reverse dot blot นี้ คือการที่สามารถออกแบบ ASO probe ให้สามารถทำปฏิกิริยาได้ในภาวะเดียวกัน ซึ่งจากการวิจัยนี้ได้ทดลองออกแบบโพรบที่มี melting temperature ใกล้เคียงกัน และได้ทดลองในขั้นตอน hybridization และ stringency washing โดยเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆกัน จนได้อุณหภูมิที่เหมาะสม

เทคนิค reverse dot blot เป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่สลับซับซ้อน มีเครื่องพีซีอาร์และอ่างควบคุมอุณหภูมิ ก็สามารถทำวิธีนี้ได้ ซึ่งเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการตรวจประจำวัน และการตรวจวินิจฉัย

บีตาธาลัสซีเมียก่อนคลอด ที่สามารถตรวจได้ตั้งแต่ไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์ น้ำยาที่ใช้โดยเฉพาะโพรบและไพรเมอร์มีความคงทน สามารเก็บได้เป็นปีโดยไม่เสียคุณสมบัติ ซึ่งเหมาะที่จะพัฒนาเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูป

จากผลการวิจัยและจากข้อมูลของห้องปฏิบัติการทั้งในและต่างประเทศ (16-18) สรุปได้ว่า วิธีที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจบีตาธาลัสซีเมียชนิด point mutations คือวิธี reverse dot blot hybridization ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีดังกล่าวและผลิตเป็นชุดน้ำยาที่สามารถนำไปใช้ได้ ในการให้บริการตรวจวินิจฉัยประจำวัน (routine diagnosis) คุณสมบัติเด่นของชุดน้ำยาที่ได้พัฒนาเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในปัจจุบันแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบวิธีการตรวจมิวเตชั่นของยีนบีตาธาลัสซีเมียที่ใช้อยู่ในปัจจุบันกับวิธีที่พัฒนาขึ้นในการวิจัยนี้

วิธีการทดสอบ ขั้นตอนการทดสอบ	Beta Gene kit ของบริษัท Bio-Rad (มีขายในตลาด)	Reverse dot blot ที่ตีพิมพ์และมีใช้ในห้องปฏิบัติการวิจัย (15-18)	Reverse dot blot ที่พัฒนาจากการวิจัยนี้
ASO-probe strip	Microwells	Nylon membrane	Nylon membrane
No. of mutation	8 mutations / strip	17 mutations / strip	17 mutations / strip
PCR preparation	ผสมใน denature solution 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	ต้มที่ 95^0ซ 5 นาที	ต้มที่ 95^0ซ 5 นาที
Hybridization	ทำปฏิกิริยาที่ 37^0ซ ใช้ microplate incubatorเป็นเวลา1 ชม.	ทำปฏิกิริยาที่ 45^0ซ ในsealed-plastic bag ขนาด 1x11 ซม. ใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 1 ชม.	ทำปฏิกิริยาที่ **อุณหภูมิห้องใน plastic tray** ขนาด 1x11 ซม. เป็นเวลา **30** นาที
Stringency wash	ใช้ ELISA washer ที่อุณหภูมิห้อง	ใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 45-50^0C ใน sealed-plastic bag	ใช้ shaker ที่ **อุณหภูมิห้องใน** plastic tray
Detection system	Enzymatic-colorimetric reaction อ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader	Enzymatic-colorimetric reaction อ่านผลด้วยตาเปล่า	Enzymatic-colorimetric reaction อ่านผลด้วยตาเปล่า
เปรียบเทียบราคา	++++	++	+
Instruments	PCR themal cycler, ELISA incubator, ELISA reader, ELISA washer	PCR themal cycler, Shaker, water bath, heater	PCR themal cycler, Shaker, heater