



การตรวจกรองการกลายพันธุ์และการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *COMT*  
ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม

**Mutation Screening and Association Study of the *COMT* Gene  
in Thai Children with Autism Spectrum Disorders**

วรทัย ไหมศรีขาว

**Worathai Maisrikhaw**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Molecular Biology and Bioinformatics  
Prince of Songkla University**

**2553**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์                    การตรวจกรองการกลายพันธุ์และการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน  
COMT ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม  
ผู้เขียน                                นางสาวรทัย ไหมศรีขาว  
สาขาวิชา                              ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพต ลิ้มประเสริฐ)

.....ประธานกรรมการ  
(ดร.อรุณรัศมี วณิชชานนท์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพต ลิ้มประเสริฐ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินิจธร รุจิระบรรเจิด)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์      การตรวจกรองการกลายพันธุ์และการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน  
COMT ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม  
ผู้เขียน                นางสาวรทัย ไหมศรีขาว  
สาขาวิชา              ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ  
ปีการศึกษา            2553

## บทคัดย่อ

ออทิซึมสเปคตรัมเป็นความผิดปกติของพัฒนาการทางระบบประสาท โดยเฉพาะ 3 ด้านหลัก คือ (1) ด้านภาษาการสื่อสาร (2) ด้านสังคมหรือการมีปฏิสัมพันธ์กับผู้อื่น และ (3) การมีพฤติกรรมซ้ำๆ หรือมีความสนใจที่เฉพาะเจาะจง การศึกษาพบว่ายีน COMT เป็นยีนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับโรคทางระบบประสาทและจิตเวชหลายโรครวมถึงกลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำ (Obsessive-Compulsive Disorder: OCD) ที่มีพฤติกรรมบางอย่างพบได้ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม เอนไซม์ COMT มีหน้าที่ควบคุมสารสื่อประสาทแคทีโคลามีนจำพวกโดปามีน นอร์อีพิเนพรีนและอีพิเนพรีน การศึกษาครั้งนี้จึงตั้งสมมติฐานว่า “การกลายพันธุ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COMT อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ COMT ส่งผลให้เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดออทิซึมสเปคตรัม” วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบใหม่ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน COMT กับเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมจำนวน 173 ราย จากคณะแพทยศาสตร์ 3 สถาบัน คือ โรงพยาบาลรามารับดี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ป่วยทุกรายได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมสเปคตรัมตามเกณฑ์ DSM-IV การศึกษาความสัมพันธ์ประกอบด้วยครอบครัวผู้ป่วยจำนวน 160 ครอบครัวและกลุ่มควบคุม 250 ราย การศึกษาครั้งนี้ตรวจกรองยีน COMT ทั้งหมด 6 เอกซอนรวมทั้งบริเวณเอกซอน-อินทรอน โดยใช้วิธีพีซีอาร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงของยีน COMT ทั้งหมด 4 แบบ (c.-130C>T, c.-91+1G>A, p.I36V และ p.M90V) ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การศึกษาครั้งนี้ยังพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COMT ทั้งหมด 10 ตำแหน่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เคยรายงานแล้ว (rs165656, rs4633, rs6267, rs4818, rs4680, rs769224, rs4646315, rs74745580, rs165631 และ IndelC/-) การศึกษาความสัมพันธ์ได้เลือกสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 เนื่องจากมีรายงานเป็นจำนวนมากในโรกระบบประสาทและจิตเวช ผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการศึกษาความสัมพันธ์แบบ Population-based case control association study

และแบบ Family-based association study ของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 ในผู้ป่วยออทิสซึม สเปคตรัมกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์การถ่ายทอดในครอบครัวแบบแฮพลไทป์สลิปส์ ตำแหน่ง rs4818 รวมกับตำแหน่ง rs4680 ผลการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้จึงไม่สามารถสรุปได้ว่ายีน COMT เป็นปัจจัยส่งเสริมต่อการเกิดออทิสซึมสเปคตรัมในเด็กไทย อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่พบใหม่ทั้ง 4 แบบในยีน COMT ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากออทิสซึมสเปคตรัมเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับยีนมากกว่าหนึ่งยีนร่วมกับปัจจัยอื่นๆ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงหน้าที่ของยีน COMT ที่พบการเปลี่ยนแปลงใหม่นี้เพื่อหาข้อสรุปต่อไป

**Thesis Title** Mutation Screening and Association Study of the *COMT* Gene in Thai Children with Autism Spectrum Disorders  
**Author** Miss Worathai Maisrikhaw  
**Major Program** Molecular Biology and Bioinformatics  
**Academic Year** 2010

## ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental disorder characterized by limited or absent verbal and nonverbal communication, a lack of reciprocal social interaction, and restricted interest and repetitive behaviors. Existing data suggest the involvement of *COMT* with several neuropsychiatric diseases, including obsessive-compulsive disorder (OCD), that are commonly found in patients with ASD. The *COMT* enzyme catalyzes the inactivation of neurotransmitter catecholamines including dopamine, norepinephrine and epinephrine. We hypothesized that variants or mutations in *COMT* gene might alter *COMT* enzyme activity predisposing to ASD. This study aimed to identify new variants or mutations and perform association study of the *COMT* gene in Thai children with ASD. One hundred and seventy-three patients were recruited from three Thai medical school hospitals, Ramathibodi, Thammasat and Songklanagarind. All patients fulfilled the criteria for a clinical diagnosis of ASD based on the DSM-IV. The parents of 160 families and 250 normal controls were also recruited into this study. Six exons and the exon-intron boundary of the *COMT* gene were screened by PCR and DNA sequencing. We found 4 new variants of the *COMT* gene (c.-130C>T, c.-91+1G>A, p.I36V and p.M90V) that have never been reported. Ten known polymorphisms were also found (rs165656, rs4633, rs6267, rs4818, rs4680, rs769224, rs4646315, rs74745580, rs165631 and IndelC/-). We selected rs4680 for the study because it is commonly used for association studies in various neuropsychiatric diseases. No significant association was found between rs4680 and Thai children with ASD in population-based case control and family-based association studies. In addition, a transmission disequilibrium test showed no significant association between the rs4818 and rs4680 haplotypes of the *COMT*

gene and Thai children with ASD. Thus, the *COMT* gene did not play a significant role in Thai children with ASD in our study. However, we cannot conclude whether the 4 new variants are mutations or polymorphisms because ASD is a complex genetic disease involving more than one gene that may interact with other factors. A functional analysis of the *COMT* gene with new variants is required for a definite conclusion.

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	
รายการตาราง	
รายการภาพประกอบ	
สัญลักษณ์คำย่อตัวย่อ	
เนื้อเรื่อง	
บทที่ 1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	20
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	
วัสดุ	21
สารเคมี	25
อุปกรณ์	27
วิธีดำเนินการ	28
บทที่ 3 ผลการวิจัย	72
บทที่ 4 บทวิจารณ์	119
บทที่ 5 บทสรุป	134
รายการเอกสารอ้างอิง	135
ภาคผนวก	145
ประวัติผู้เขียน	195

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ของสนิปส์บนยีน <i>COMT</i> จากรายงานการศึกษาในกลุ่มอาการจิตเภทและการศึกษาอื่นๆ ที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	18
2. แสดงจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV	21
3. แสดงจำนวนกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษาการตรวจการกลายพันธุ์บนยีน <i>COMT</i>	23
4. แสดงไพรเมอร์สำหรับการทำพีซีอาร์การตรวจการกลายพันธุ์บนยีน <i>COMT</i> ทั้งหมด 6 เอกซอน	33
5. แสดงส่วนประกอบและสภาวะสำหรับการทำพีซีอาร์การตรวจการกลายพันธุ์บนยีน <i>COMT</i>	33
6. แสดงสภาวะสำหรับการทำพีซีอาร์การตรวจการกลายพันธุ์บนยีน <i>COMT</i>	34
7. แสดงไพรเมอร์ของสนิปส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน <i>COMT</i> จากการศึกษาของ Ruiz-Sanz et al., 2007	48
8. แสดงส่วนประกอบและสภาวะสำหรับการทำพีซีอาร์ของสนิปส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน <i>COMT</i>	48
9. แสดงสภาวะสำหรับการทำพีซีอาร์ของสนิปส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน <i>COMT</i>	49
10. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>COMT</i> บริเวณเอกซอน 1	76
11. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>COMT</i> บริเวณเอกซอน 2	78
12. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>COMT</i> บริเวณเอกซอน 3	81
13. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>COMT</i> บริเวณเอกซอน 4	84
14. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>COMT</i> บริเวณเอกซอน 5	87
15. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน <i>COMT</i> บริเวณเอกซอน 6	91
16. แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบบนยีน <i>COMT</i> ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม	93
17. แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับการถ่ายทอดในบิดาและมารดาผู้ป่วยโดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	98
18. แสดงจำนวนประชากรที่ใช้ทดสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบ	104
19. แสดงการทดสอบฮาร์ดี-ไวเบอร์กและค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตในกลุ่มควบคุม (250) สนิปส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน <i>COMT</i>	110



## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
20. แสดงความถี่แอลลีลของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน <i>COMT</i> ในผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม PLINK	111
21. แสดงความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน <i>COMT</i> ในผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม PLINK	112
22. แสดงค่าความน่าจะเป็น (P-value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน <i>COMT</i> ในผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model	114
23. แสดงการถ่ายทอดแอลลีลของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4818 บนยีน <i>COMT</i> ในครอบครัวผู้ป่วยด้วยโปรแกรม PLINK	115
24. แสดงการถ่ายทอดแอลลีลของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน <i>COMT</i> ในครอบครัวผู้ป่วยด้วยโปรแกรม PLINK	116
25. แสดงการถ่ายทอดความถี่แฮพล์ไทป์ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4818 และ rs4680 ตามลำดับบนยีน <i>COMT</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดจากการใช้โปรแกรมแฮพล์วิว	118
26. แสดงลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง p.I36V	125
27. แสดงลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง p.M90V	127
28. แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมจากการศึกษาแบบ Population-based case control study	131
29. แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมจากการศึกษาแบบ Family-based study	133
30. แสดงตำแหน่งสไนป์ส์บนยีน <i>COMT</i>	160

## รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. แสดงโครงสร้างยีน <i>COMT</i>	6
2. แสดงกระบวนการแคทาบอไลซึมของโดปามีน	8
3. แสดงกระบวนการแคทาบอไลซึมของนอร์อิพิเนฟรินที่ปลายประสาท Noradrenergicm	9
4. แสดงแผนภาพแสดงการคัดเลือกและคัดกรองผู้ป่วย	24
5. แสดงการตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน <i>COMT</i> ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึม สเปคตรัม	31
6. แสดงตำแหน่งการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์บนยีน <i>COMT</i> ที่ได้จาก ไพรมเมอร์แต่ละคู่	32
7. แสดงการเขียนสัญลักษณ์ความผิดปกติระดับดีเอ็นเอของยีน <i>COMT</i> ในรูปแบบ MB-COMT	40
8. แสดงหน้าแรกของโปรแกรม SIFT	41
9. แสดงหน้าต่างสำหรับกรอกข้อมูล email address และ Protein sequence ก่อน การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SIFT	42
10. แสดงหน้าต่างสำหรับกรอกข้อมูล Substitution to be predicted on” และ “Parameters” ก่อนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SIFT	43
11. แสดงหน้าต่างหลักที่แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SIFT	44
12. แสดงผลการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่อาจส่งผล กระทบต่อหน้าที่ของโปรตีนในตำแหน่ง I36V และ M90V	45
13. แสดงผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นไปได้ที่คำนวณโดยโปรแกรม SIFT ตำแหน่ง I36V และ M90V	46
14. แสดงผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่สนใจตำแหน่ง I36V	47
15. แสดงผลพีซีอาร์แบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสนิปส์ตำแหน่ง rs4680	50
16. แสดงการเตรียมข้อมูลจีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา	51
17. แสดงแผนที่ (Map) ที่ระบุถึงตำแหน่งของสนิปส์ที่ต้องการศึกษา	53
18. แสดงการใช้โปรแกรม Command Prompt เพื่อเข้าสู่ไฟล์ที่จะใช้ในการวิเคราะห์ ข้อมูล	54

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
19. แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะสมดุล	55
20. แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะสมดุล	56
21. แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบแอลลีลรูปแบบคำสั่ง --assoc	58
22. แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบแอลลีลรูปแบบชุดคำสั่ง --assoc	58
23. แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบจีโนไทป์รูปแบบคำสั่ง --model	60
24. แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบจีโนไทป์รูปแบบชุดคำสั่ง --model	60
25. แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบจีโนไทป์รูปแบบคำสั่ง --logistic	62
26. แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบจีโนไทป์รูปแบบชุดคำสั่ง --logistic	62
27. แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์การถ่ายทอดภายในครอบครัวรูปแบบคำสั่ง --tdt	64
28. แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์การถ่ายทอดภายในครอบครัวรูปแบบคำสั่ง --tdt	65
29. แสดงแผนที่ (Map) ที่ระบุถึงตำแหน่งของสนิปส์ที่ต้องการศึกษาสำหรับโปรแกรมแฮโพลิว	66
30. แสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมแฮโพลิว 4.0	67
31. แสดงผลการวิเคราะห์จากการตรวจสอบคุณสมบัติของตำแหน่งสนิปส์	68
32. แสดงผลการวิเคราะห์ Linkage disequilibrium (LD Plot)	69
33. แสดงผลการวิเคราะห์บล็อก (Blocks) และแฮโพลไทป์ (Haplotype)	70
34. แสดงผลการศึกษาความสัมพันธ์ของสนิปส์ตำแหน่งเดียว	70
35. แสดงผลการศึกษาความสัมพันธ์ของสนิปส์หลายๆ ตำแหน่ง	71
36. แสดงความผิดปกติของโครโมโซม 13 แบบวงแหวนในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมจากการย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิค GTG-banding	73
37. แสดงการตรวจโครโมโซมด้วยเทคนิค FISH บริเวณ q34 ของโครโมโซม 13	73

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
38. แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ 3 คู่บนยีน <i>COMT</i> เอกซอน 1-6	74
39. แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 1 บนยีน <i>COMT</i> และการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์	75
40. แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 2 บนยีน <i>COMT</i>	77
41. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่ง rs165656 (c.-1+51G>C) นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอยีน <i>COMT</i> บริเวณอินทรอน 2	79
42. แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 3 บนยีน <i>COMT</i> และการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์	80
43. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่ง rs74745580, rs4633 และ rs6267	82
44. แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 4 บนยีน <i>COMT</i>	83
45. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่ง rs4818 และ rs4680	85
46. แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 5 บนยีน <i>COMT</i>	86
47. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่ง rs769224, rs165631 และ rs464315	88
48. แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 6 บนยีน <i>COMT</i>	90
49. แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' ตำแหน่งสนิปส์บริเวณเอกซอน 6	92
50. แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง c.-130C>T โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อเล็กโตรเฟอโรแกรม	94
51. แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง c.-91+1G>A โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อเล็กโตรเฟอโรแกรม	95
52. แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง p.I36V โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อเล็กโตรเฟอโรแกรม	96

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
53. แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง p. M90V โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ อิเล็กโตรเฟอโรแกรม	97
54. แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-130C>T	99
55. แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-91+1G>A	100
56. แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.106A>G (p.I36V)	101
57. แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.268A>G (p.M90V)	102
58. แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นตำแหน่ง p.I36V	103
59. แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นตำแหน่ง p.M90V	104
60. แสดงผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ p.I36V	105
61. แสดงผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ p.M90V	106
62. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มของตำแหน่ง c.472G>A, p. V158M (rs4680)	107
63. แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์ตำแหน่ง rs4818 และ rs4680 ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (160 ครอบครัว)	117
64. แสดงยีนบนโครโมโซม 13 ตำแหน่ง q34ter ซึ่งคาดว่าจะมียีนที่ขาดหายไป	120
65. แสดงตำแหน่งสลิปส์ที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน COMT บริเวณเอกซอน 1 - 6 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม	121
66. แสดงโครงสร้างยีน COMT บริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วย 2 ราย c.-130C>T และ c.-91+1G>A	124
67. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COMT ที่ระบุตำแหน่งสลิปส์	146
68. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COMT ที่ระบุตำแหน่งตำแหน่งของไพรเมอร์	189

## สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ADI-R	Autism Diagnostic Interview-Revised
ADOS	Autism Diagnostic Observation Schedule
APS	Ammonium persulfate
ASD	Autism Spectrum Disorders
BLAST	Basic Local Alignment Search Tools
bp	base pairs
CHAT	Checklist for Autism in Toddlers
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
Conc.	Concentration
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOMA	3,4-Dihydromandelic acid
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid
DSM-IV	Diagnostic and statistical manual of mental disorder, fourth edition
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FISH	Fluorescence In <i>situ</i> Hybridization
<i>FMR1</i>	Fragile X mental retardation 1
FXS	Fragile X syndrome
HVA	Homovanillic acid
HWE	Hardy Weinberg equilibrium
IQ	intelligence quotient
LD	Linkage disequilibrium
M	molar

## สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

MAO	Monoamine oxidase
MB-COMT	Membrane-Bound Catechol-O-Methyltransferase
mg	milligram
MHPG	3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol
ml	milliliter
mM	millimolar
MTX	Metotrexate
ng	nanogram
PCR	Polymerase chain reaction
PDDs	Pervasive Developmental Disorders
PDD-NOS	Pervasive Development Disorder-Not Otherwise Specified
PHA	Phytohemagglutinin
OCD	Obsessive-Compulsive Disorder
r	ring chromosome
rpm	revolution per minute
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SAM	s-adenosyl methionine
SB:V	Stanford-Binet Intelligence Scale: Fifth Edition
S-COMT	Soluble Catechol-O-Methyltransferase
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SNP	Single Nucleotide polymorphism
TAE	Tris-acetate buffer
TBE	Tris-borate buffer
TE	Tris-EDTA buffer
TEMED	N, N, N, N -Tetramethyl-Ethylenediamine
TDT	Transmission Disequilibrium Test
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
VMA	3,4-methoxy-4-hydroxy-mandelicacid

## สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

°C	degree Celsius
μl	microliters
μM	micromolar



# บทที่ 1

## บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

ออทิสซึมจัดอยู่ในกลุ่มพัฒนาการผิดปกติแบบรอบด้าน (Pervasive Development Disorder) จากระบบการจำแนกโรคตาม DSM-IV (Diagnostic and statistical manual of mental disorder, fourth edition) ปัจจุบันนิยมเรียกกันว่า ออทิสซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorders: ASD) อาการทั้งหมดเป็นความผิดปกติ 3 ด้านหลัก คือ (1) ทักษะทางสังคมหรือการมีปฏิสัมพันธ์กับผู้อื่น (2) ทักษะทางการสื่อสาร และ (3) การมีพฤติกรรมซ้ำๆ หรือมีความสนใจที่เฉพาะเจาะจง ลักษณะอาการมักเริ่มมีก่อนอายุ 3 ขวบ ปัจจุบันความชุกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น พบความชุกเฉลี่ยทั่วโลกประมาณ 7-10 รายต่อประชากร 10,000 ราย และในประเทศไทยพบประมาณ 10 รายต่อประชากร 10,000 ราย พบในเด็กผู้ชายมากกว่าเด็กผู้หญิงอัตราส่วน 4:1 ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของความผิดปกติที่ชัดเจน แต่พบว่าร้อยละ 10 ของผู้ป่วยออทิสซึมอาจมีสาเหตุมาจากความผิดปกติของโครโมโซม การติดเชื้อขณะตั้งครรภ์หรือผลจากสารเคมี ความผิดปกติของยีนเดี่ยว ส่วนร้อยละ 90 อาจมีความผิดปกติของยีนเข้ามาเกี่ยวข้องแบบหลายยีนหรือปัจจัยจากยีนร่วมกับสิ่งแวดล้อม (Multifactorial Inheritance)

โปรตีน COMT มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอไลซึมของโดปามีนและสารสื่อประสาทจำพวกแคทีโคลามีน นอกจากนี้ยังมีรายงานพบความสัมพันธ์กับยีน COMT ในโรคจิตเวชหลายโรค เช่น กลุ่มอาการทางจิตเภท (Schizophrenia) กลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำ (Obsessive-Compulsive Disorder: OCD) เป็นต้น แต่ยังมีการศึกษาที่น้อยมากระหว่างยีน COMT กับภาวะออทิสซึม ดังนั้นจึงมีความสนใจศึกษาการตรวจกรองการกลายพันธุ์และการศึกษาความสัมพันธ์กับยีน COMT กับเด็กไทยที่เป็นออทิสซึมสเปกตรัมซึ่งอาจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพยาธิชีววิทยาของออทิสซึมต่อไป

## การตรวจเอกสาร

### ออทิซึม

ออทิซึมเป็นคำทับศัพท์ภาษาอังกฤษ “autism” มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก “autos” ที่แปลว่า “ตนเอง” มีการบันทึกเป็นครั้งแรกโดย Eugen Bleuler จิตแพทย์ชาวสวิสเซอร์แลนด์ ในปี ค.ศ.1911 โดยสังเกตว่ามีคนกลุ่มหนึ่งชอบแยกตัวเองออกจากสังคมของคนรอบข้าง ไม่ชอบการใช้ชีวิตร่วมกับคนอื่น ๆ ในสังคม แต่โรคดังกล่าวยังไม่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย จนกระทั่งมีการรวบรวมและจัดเป็นภาวะความผิดปกติขึ้นในปี ค.ศ.1943 โดย Leo Kanner จิตแพทย์ชาวอเมริกัน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยจอห์นฮอปกินส์ รายงานจำนวนผู้ป่วยเด็ก 11 ราย ที่มีอาการแปลกๆ เช่น พูดเลียนเสียง พูดซ้ำ สื่อสารไม่เข้าใจ ทำอะไรซ้ำๆ ไม่ชอบเปลี่ยนแปลง ไม่สนใจคนอื่น และได้ติดตามเด็กอยู่ 5 ปี พบว่าเด็กเหล่านี้ต่างจากเด็กปัญญาอ่อน จึงเรียกเด็กที่มีอาการเช่นนี้ว่า ออทิสซึม

ออทิซึม (OMIM 209850) จัดอยู่ในกลุ่มพัฒนาการผิดปกติแบบรอบด้านจากระบบการจำแนกโรคตาม DSM-IV ปัจจุบันนิยมเรียกกลุ่มอาการออทิซึมที่มีลักษณะทางคลินิกหลากหลายทั้งแบบชัดเจนและไม่ชัดเจนว่า ออทิสซึมสเปคตรัม เป็นความผิดปกติของพัฒนาการทางระบบประสาท อาการทั้งหมดเป็นความผิดปกติ 3 ด้านหลัก คือ (1) ทักษะทางสังคมหรือการมีปฏิสัมพันธ์กับผู้อื่น (2) ทักษะทางการสื่อสาร และ (3) การมีพฤติกรรมซ้ำๆ หรือมีความสนใจที่เฉพาะเจาะจง ลักษณะอาการมักเริ่มมีก่อนอายุ 3 ขวบ และหากผู้ป่วยมีอาการไม่ครบตามเกณฑ์วินิจฉัยของออทิซึมกำหนดให้เป็น PDD-NOS (Pervasive Development Disorder–Not Otherwise Specified) ผู้ป่วยออทิซึมส่วนใหญ่มักมีระดับสติปัญญาอยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่าปกติหรือภาวะปัญญาอ่อนมีความบกพร่องของระดับสติปัญญา (IQ) ซึ่งมีคะแนนต่ำกว่า 70 อาจมีความผิดปกติของพัฒนาการเกี่ยวกับการเรียนรู้ที่ไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสังคมร่วมด้วย (Simonoff et al., 1996)

อุบัติการณ์การเกิดภาวะออทิซึมมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยพบว่าในช่วงปี ค.ศ. 1966-2005 มีอัตราการเกิดภาวะออทิซึมอยู่ในช่วง 0.7-72.6 รายต่อประชากร 10,000 ราย ขึ้นอยู่กับขนาดตัวอย่างที่ศึกษาและเกณฑ์วินิจฉัย โดยในปี ค.ศ. 1966-1993 พบความชุกของการเกิดโรคประมาณ 5 รายต่อประชากร 10,000 ราย และในช่วงปี ค.ศ. 1987-2004 พบความชุกประมาณ 13 รายต่อประชากร 10,000 ราย และในปี ค.ศ. 2005 Fombonne ได้ศึกษาและรวบรวมข้อมูลจากการใช้แบบการสำรวจ DSM-IV ในประเทศแคนาดาพบความชุกประมาณ 22 รายในประชากร 10,000 ราย สำหรับประเทศไทยพบความชุกของออทิซึมประมาณ 10 รายต่อประชากร 10,000 ราย (Poolsupasit et al., 2005) และพบในเด็กผู้ชายมากกว่าเด็กผู้หญิงในอัตราส่วน 4:1 (Fombonne, 2003; 2005) การเพิ่มขึ้นนี้อาจมาจากการเปลี่ยนเกณฑ์การวินิจฉัย

ให้ครอบคลุมอาการของโรคมากขึ้น รวมถึงมีผู้สนใจศึกษาอย่างแพร่หลาย นอกจากการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางคลินิกตามเกณฑ์การวินิจฉัยของสมาคมจิตแพทย์ในประเทศสหรัฐอเมริกา The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, fourth edition (DSM-IV) เป็นมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไปและยังมีการใช้วิธีหรือแนวทางการวินิจฉัยอื่นๆ เช่น แบบสัมภาษณ์ Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) แบบสังเกตพฤติกรรม Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS) เป็นต้น และมีการใช้เครื่องมือเพื่อการคัดกรองที่มีความจำเพาะต่อการวินิจฉัยคือ Checklist for Autism in Toddlers (CHAT)

แม้ออทิซึมสเปกตรัมจะมีความผิดปกติของพัฒนาการทางสมองหรือระบบประสาท แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด พบร้อยละ 10 ของผู้ป่วยออทิซึมอาจมีสาเหตุมาจากความผิดปกติหลายสาเหตุ ได้แก่

(1) ความผิดปกติของโครโมโซมพบวาร์ร้อยละ 1.7–9.0 ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีโครโมโซมผิดปกติจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค GTG-banding (Gillberg et al., 1998; Reddy, 2005; Wassink et al., 2001) จากการรวบรวมผลการตรวจโครโมโซมทำให้ทราบตำแหน่งบนโครโมโซมที่มักพบความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม คือ ตำแหน่งโครโมโซม 2q37 ลักษณะอาการที่ปรากฏจะขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วนที่ขาดหายไปของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม (Ghaziuddin et al., 1999; Wolff et al., 2002) จากการรวบรวมข้อมูลพบตำแหน่งโครโมโซม 7q บางส่วนผิดปกติ มีการกลับทิศทาง (Ashley-Koch et al., 1999) การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซมอื่น (Vincent et al., 2000) การขาดหายไป (Rossi et al., 2008) ตำแหน่งโครโมโซม 15q11-13 พบความผิดปกติประมาณร้อยละ 1-2 (Freitag et al., 2007; Benvenuto et al., 2009) ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม เกิดจากการเกินมาหรือกลับทิศทางของชิ้นส่วนโครโมโซม (Bundey et al., 1994; Ozand et al., 2003) ความผิดปกติดังกล่าวเสี่ยงต่อการเกิดภาวะชัก ภาวะปัญญาอ่อน และตำแหน่งโครโมโซม 16p11.2 มีการเกินหรือขาดหายไป (Behjati et al., 2008; Kumar et al., 2008) ส่งผลให้ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีภาวะปัญญาอ่อน หน้าตาผิดปกติ มือและเท้าเล็กผิดปกติ

(2) การติดเชื้อขณะตั้งครรภ์และสารเคมี มารดามีโรคแทรกซ้อนก่อนคลอดและระหว่างคลอด พบผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมติดเชื้อในสมอง เช่น หัดเยอรมัน หรือโรคที่เป็นมาแต่กำเนิดเป็นผลมาจากภาวะแทรกซ้อนของมารดาซึ่งเกิดก่อนคลอดและระหว่างคลอดส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดความผิดปกติทางระบบประสาทหรือสมอง สารเคมีหรือสารพิษต่างๆ บางชนิดจะส่งผลต่อระบบการทำงานของประสาททำให้ผู้ป่วยมีลักษณะอาการและพฤติกรรมคล้ายเด็กออทิซึม (Faras et al., 2010)

(3) ความผิดปกติของยีนเดี่ยว เช่น กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (Fragile X Syndrome) โรคทูเบอร์รัส สเคโรซิส (Tuberous Sclerosis) และกลุ่มอาการเรตต์

(Rett Syndrome) พบผู้ป่วยออทิสซึมที่เกิดความผิดปกติของยีนเดี่ยวมีปัญหาด้านพัฒนาการของระบบประสาท ซึ่งส่งผลต่อภาวะปัญญาอ่อนและพฤติกรรมที่ผิดปกติไป

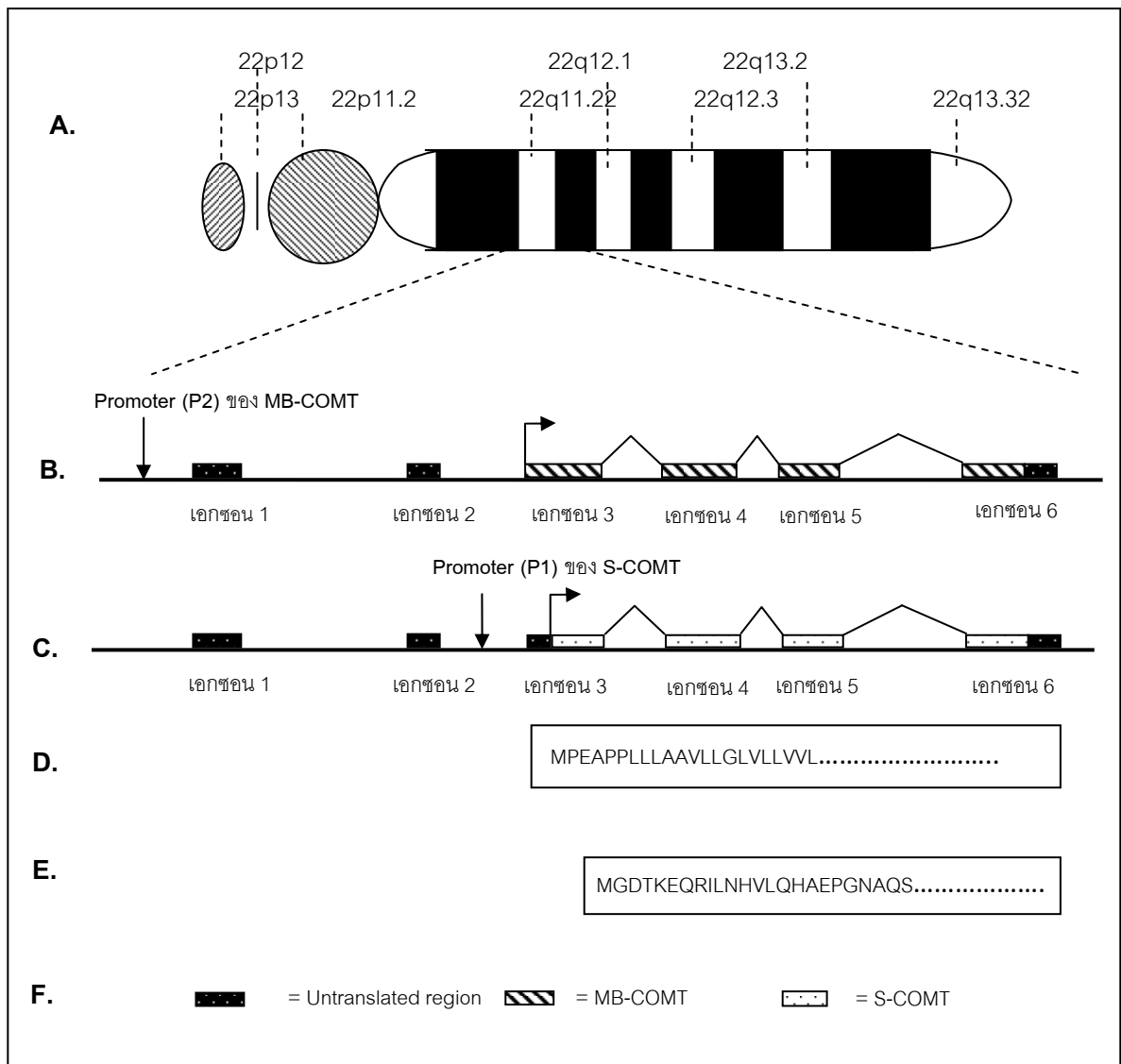
นอกจากนี้ยังพบภาวะหรือโรคอื่นๆ ร่วมกับกลุ่มอาการออทิสซึมสเปคตรัม คือ ภาวะปัญญาอ่อน ภาวะชักหรือโรคลมชัก และชนสมาธิสั้น

การเกิดภาวะออทิสซึมจัดว่าเป็นโรคทางพันธุกรรมแบบพหุปัจจัย (Multifactorial Inheritance) ที่มีอิทธิพลจากยีนมากที่สุด เนื่องจากการศึกษาในคู่แฝดและญาติที่มีความใกล้ชิดทางสายเลือดในเด็กเกิดใหม่ที่เป็นคู่แฝด โดยพบอุบัติการณ์ออทิสซึมในแฝดร่วมไข่ (Monozygotic twins) ได้มากถึงร้อยละ 60-91 (Bailey et al., 1995) แต่พบเพียงร้อยละ 0-10 ในคู่แฝดต่างไข่ (Dizygotic twins) โอกาสเกิดออทิสซึมซ้ำในพี่น้องของผู้ป่วยออทิสซึมเท่ากับร้อยละ 2-8 โดยมีความชุกมากกว่าประชากรทั่วไปประมาณ 50-100 เท่า (Bailey et al., 1998; Cook, 2001; Le Couteur et al., 1996; Freitag, 2007) การศึกษาวิจัยพบยีนบนโครโมโซมหลายตำแหน่งที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดความผิดปกติของกลุ่มอาการออทิสซึม เช่น ยีน *RELN*, *GABRB3*, *NRXN1*, *NLGN3* และ *NLGN4* เป็นต้น ทำให้เชื่อได้ว่าความผิดปกติของยีนบนโครโมโซมหลายตำแหน่งเหล่านี้ส่งผลต่อความผิดปกติของสมองและทำให้เกิดพฤติกรรมผิดปกติในผู้ป่วย นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาอื่น ๆ ในกลุ่มของโรคที่มีความผิดปกติของพัฒนาการทางสมอง ระบบประสาท โดยเฉพาะอาการของโรคย้ำคิดย้ำทำบางอย่างพบได้ในพฤติกรรมของเด็กออทิสติกซึ่งในกลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำมีการศึกษาความสัมพันธ์กับยีน *COMT*, *BDNF*, *DISC1*, *HTR2A* และ *DRD2* เป็นต้น และโปรตีน COMT มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเมทาบอลิซึมของโดปามีนและสารสื่อประสาทจำพวกแคทีโคลามีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของสมอง ดังนั้นจึงมีความสนใจศึกษาการตรวจกรองการกลายพันธุ์และการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *COMT* กับเด็กไทยที่เป็นออทิสซึมสเปคตรัม

## ยีน *Catechol-O-Methyltransferase (COMT)*

### โครงสร้างของยีน

ยีน *COMT* (OMIN 116790) เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม 22 (Brahe et al., 1986) แขนข้างยาว (q) บริเวณตำแหน่ง q11.21 (Grossman et al., 1991) ยีน *COMT* มีขนาด 27.221 กิโลเบส ประกอบด้วย 6 เอกซอน ยีน *COMT* สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีน *COMT* ซึ่งมี 2 รูปแบบ (Tenhunen and Ulmanen, 1993; Tenhunen et al., 1994) คือ ส่วนที่เกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์เป็น Membrane-Bound Catechol-O-Methyltransferase (MB-COMT) ผลิตจากเซลล์ประสาทในสมองและอีกรูปแบบคือส่วนที่เป็นสารละลาย Soluble Catechol-O-Methyltransferase (S-COMT) ผลิตจากตับ ไต เลือดและเนื้อเยื่อต่างๆ โปรตีน *COMT* ทั้งสองรูปแบบเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ควบคุมสารสื่อประสาทจำพวกแคทีโคลามีน ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของโปรตีน *COMT* ทั้งสองรูปแบบต่างกันทำให้การถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอที่ต่างกันโดย MB-COMT มีตำแหน่งโปรโมเตอร์บริเวณ 5'UTR สามารถถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ จำนวน 1,290 ตำแหน่ง S-COMT มีตำแหน่งโปรโมเตอร์บริเวณอินทรอน 2 สามารถถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ จำนวน 1,070 ตำแหน่ง แต่การเริ่มสร้างโปรตีนจะเริ่มที่เอกซอน 3 เหมือนกันแต่คนละตำแหน่งในการเริ่มต้นแปลรหัสทำให้โปรตีน MB-COMT มีลำดับกรดอะมิโนมากกว่าโปรตีน S-COMT จำนวน 50 ตำแหน่ง โดยโปรตีน MB-COMT ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 271 ตำแหน่ง มวลโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนตอนต้นจำนวน 50 ตำแหน่งของโปรตีน MB-COMT เป็น Hydrophobic signal anchor domain (Ulmanen and Lundstrom, 1991; Bertocci et al., 1991) กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำและเกาะติดกับเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ (Rough Endoplasmic Reticulum) (Tilgmann et al., 1992; Tenhunen and Ulmanen, 1993) และส่วนที่เหลือ 221 ตำแหน่งของ MB-COMT จะลอยอยู่ในไซโทพลาซึม โปรตีน S-COMT ประกอบด้วยกรดอะมิโน 221 ตำแหน่ง มวลโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน กรดอะมิโนทั้งหมดจะลอยอยู่ในไซโทพลาซึม (รูปที่ 1)



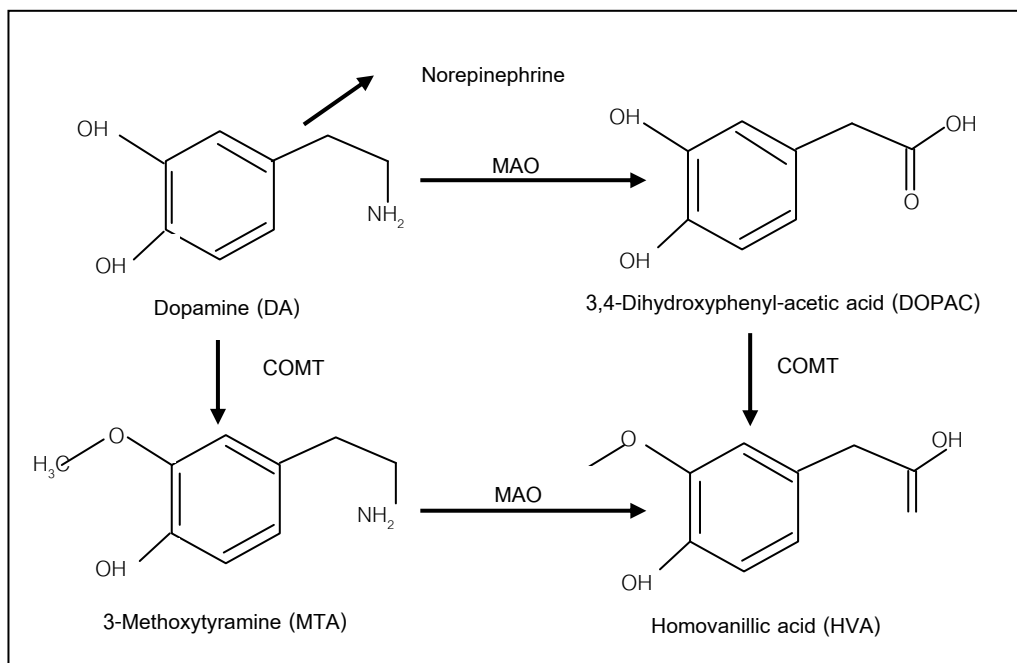
**รูปที่ 1** แสดงโครงสร้างยีน *COMT* ลูกศร ↓) แสดงตำแหน่งของโปรโมเตอร์ที่ต่างกันจึงถอดรหัสของเอ็มอาร์เอ็นเอต่างกันและลูกศร (↗) แสดงตำแหน่งการแปลรหัสเป็นโปรตีนแต่ละรูปแบบ (A) ตำแหน่งยีน *COMT* บนโครโมโซม 22 (B) รูปแบบ MB-COMT สังเคราะห์ที่โปรตีน MB-COMT (C) รูปแบบ S-COMT สังเคราะห์ที่โปรตีน S-COMT (D) ลำดับกรดอะมิโนบริเวณส่วนต้นของโปรตีน MB-COMT (E) ลำดับกรดอะมิโนบริเวณส่วนต้นของโปรตีน S-COMT (F) อธิบายสัญลักษณ์ของโครงสร้างยีน *COMT*

## หน้าที่ของโปรตีน COMT

โปรตีน COMT ถูกพบครั้งแรกและกำหนดชื่อเมื่อปี ค.ศ. 1958 โดย Julius Axelrod นักชีวเคมี โปรตีน COMT มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบแอลฟาเฮลิกซ์ ( $\alpha$ -helix) และแบบพลีตบีตา ( $\beta$ -pleated sheet) ประกอบด้วยแบบแอลฟาเฮลิกซ์ 8 ตัวที่จัดเรียงล้อมรอบแบบพลีตบีตาซึ่งอยู่ตรงกลาง โปรตีน COMT จะมีเอส-อดีโนซิล-เมทไทโอนีน (S-Adenosyl-L-Methionine: SAM หรือ AdoMet) เป็นสารตั้งต้นประเภทแคทีโคลามีน น้ำ และแมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ) เข้ามาจับเกิดเป็นกระบวนการเมทิลทรานสเฟอเรส (Methyl transferase) ทำปฏิกิริยาโยกย้ายหมู่เมทิลจาก AdoMet ให้แก่สารตั้งต้นประเภทแคทีโคลามีน (Männistö and Kaakkola, 1999) จำพวกโดปามีน นอร์อีพิเนฟรินและอีพิเนฟริน โปรตีน COMT เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการเมทาบอลิซึมของสารภายในเซลล์ เช่น ยาจำพวกแคทีโคลามีนที่ใช้ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง โรคหืดหอบและโรคพาร์คินสัน นอกจากนี้ โปรตีน COMT ที่พบภายนอกเซลล์ (Extracellular) ทำหน้าที่ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของสารสื่อประสาทเกิดขึ้นบริเวณไซแนปส์

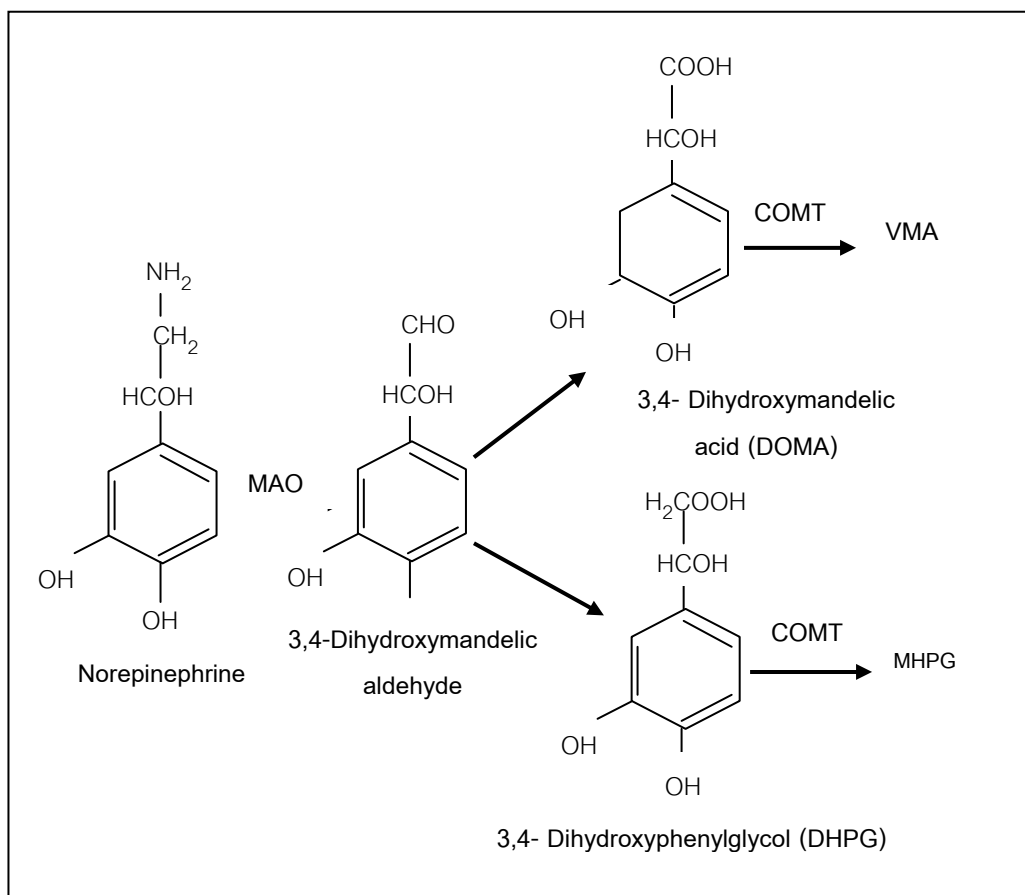
โดปามีนเป็นสารสื่อประสาทในกลุ่มแคทีโคลามีน สร้างมาจากกรดอะมิโนไทโรซีนและสารตั้งต้นอื่นๆ บริเวณปลายประสาท โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไฮดรอกซิเลส (Tyrosine hydroxylase) กลายเป็น L-dopa ที่เป็นสารตั้งต้นของโดปามีน จากนั้น L-dopa ถูกเปลี่ยนเป็นโดปามีนโดยดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase) จากกลุ่มเซลล์ประสาทที่สร้างโดปามีนและจากกลุ่มเซลล์ประสาทที่สร้างอะดรีเนอจิก มีเอนไซม์โดปามีนเบต้าไฮดรอกซิเลส (Dopamine- $\beta$ -hydroxylase) เปลี่ยนโดปามีนเป็นนอร์อีพิเนฟริน ในสมองบางบริเวณการสร้างแคทีโคลามีน จะหยุดกระบวนการแคโดปามีนซึ่งจะหลั่งออกมาเป็นสารสื่อประสาทโดปามีนที่หลั่งออกมาจะถูกเก็บกลับคืนโดย Active reuptake mechanism และถูกทำให้เปลี่ยนสภาพโดย Monoamine Oxidase (MAO) และ Catechol-O-Methyltransferase กลายเป็น 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) และ Homovanillic acid (HVA) (รูปที่ 2) (ราตรี และ วีระชัย, 2550)

ส่วนนอร์อีพิเนฟรินเป็นสารสื่อประสาทหลักของกลุ่มเซลล์ซิมพาเทติกของระบบประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติก สารนอร์อีพิเนฟรินพบภายในร่างกาย หลายตำแหน่ง สารนอร์อีพิเนฟรินที่หลั่งออกมาแล้วบางส่วนถูกเก็บคืนเข้าสู่ปลายประสาท Presynaptic บางส่วนถูกทำลายโดยเอนไซม์ Monoamine Oxidase (MAO) กลายเป็น 3,4-Dihydroxymandelic acid (DOMA) และ glycol (DHPG) สารประกอบเหล่านี้จะเข้าสู่กระแสเลือดและถูกทำลายโดย COMT กลายเป็น VMA และ MHPG (รูปที่ 3) (ราตรี และ วีระชัย, 2550)



**รูปที่ 2** แสดงกระบวนการแตกทาบอิลซีเอ็มของโดปามีนโดย Monoamine Oxidase (MAO) และ Catechol-O-Methyltransferase (COMT) (ดัดแปลงจากการหนังสือประสาทสรีรวิทยา รัตรี และ วีระชัย, 2550)





**รูปที่ 3** แสดงกระบวนการแตกทาบโอลิซิมของนอร์อิพิเนพรีนที่ปลายประสาท Noradrenergic สารประกอบ Acid และ Glycol ที่เกิดเข้าสู่กระแสเลือดและถูกทำลายต่อโดย Catechol-O-Methyltransferase (COMT) กลายเป็น 3,4-Methoxy-4-hydroxy-mandelicacid (VMA) และ 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglycol (MHPG) (ดัดแปลงจากการหนังสือประสาทสรีรวิทยา ราชตรี และ วีระชัย, 2550)

ยีน *COMT* มีความสำคัญต่อสมองส่วนหน้า ซึ่งจะมีหน้าที่รวบรวมและส่งข้อมูลจากส่วนอื่นๆ ของสมองที่เกี่ยวข้องกับบุคลิกภาพ การวางแผน พฤติกรรมย่ำคิดย่ำทำ การคิดเชิงพรรณนา อารมณ์ และการทำงานของหน่วยความจำระยะสั้น เพื่อให้การทำงานเกิดประสิทธิภาพ สมองส่วนหน้าต้องส่งสัญญาณโดยสารสื่อประสาท ยีน *COMT* จะมีหน้าที่หลักที่จะช่วยรักษาระดับของสารสื่อประสาทในสมองให้เหมาะสม โปรตีน *COMT* เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงแคทีโคลามีนที่เกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทในสมอง (Calvo et al., 2009) จากคุณสมบัติของเอนไซม์ *COMT* ทำให้มีการพัฒนา *COMT* inhibitor (Mannisto and Kaakkola, 1989) ที่ใช้ในการยับยั้ง เอนไซม์ *COMT* ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมสารสื่อประสาท และถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคพาร์คินสันโดยรู้จักในชื่อของ Entacapone และ Tolcapone

## การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์ (Mutation) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงระดับยีน เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการจัดเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอที่มีลักษณะใหม่ต่างจากเดิม ส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพการทำงาน หรือมีการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่มากกว่าปกติหรือทำหน้าที่ใหม่ที่ผิดปกติออกมาแทน การกลายพันธุ์ที่อาจมีผลต่อการทำงานของยีน *COMT* ประกอบด้วยการกลายพันธุ์แบบต่างๆ ดังนี้

(1) การขาดหายไป (Deletion) หรือ การแทรกเพิ่ม (Insertion) เป็นการขาดหายหรือการแทรกเพิ่มของเบสมากกว่าหนึ่งเบสขึ้นไปในลำดับเบสหนึ่ง ๆ ส่งผลต่อการแปลรหัสพันธุกรรม ทำให้โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือขัดขวางการทำหน้าที่ของยีน

(2) การกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนรหัส (Missense mutation) การกลายพันธุ์ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเป็นการเปลี่ยนแปลงเฉพาะที่ (Point mutation) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดเฉพาะกับเบสตำแหน่งเดียวหรือเกิดกับเบสจำนวนไม่มาก โดยที่โปรตีนจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปจากเดิม ขึ้นอยู่กับหน้าที่ของโปรตีนในภาวะปกติ

(3) การกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนเป็นรหัสหยุด (Nonsense mutation) การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโคดอนสำหรับกรดอะมิโนตัวหนึ่งถูกแทนที่ด้วย Stop codon ได้โปรตีนสั้นลงกว่าเดิมซึ่งทำหน้าที่ได้น้อยลงหรืออาจสูญเสียการทำงานไปทั้งหมด

(4) การกลายพันธุ์แบบเลื่อนกรอบแปลรหัส (Frameshift mutation) การมีเบสหนึ่งตัวแทรกเพิ่มหรือขาดหายไป ทำให้กรอบการแปลรหัสพันธุกรรมนับจากตำแหน่งนั้นเปลี่ยนไป

(5) การกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน (Transcriptional mutation) เกิดจากความผิดปกติในกระบวนการสังเคราะห์และตกแต่งเอ็มอาร์เอ็นเอและส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนผิดปกติ โดยบริเวณที่สำคัญของยีน คือ Promoter, Enhancer, Cap site, Exon/intron splice region และ Polyadenylation signal

## ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single Nucleotide polymorphism; SNP) หรือสนิปส์

สนิปส์ หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แต่ละบุคคลมีลำดับเบสต่างกันเพียงตำแหน่งเดียวบนโครโมโซมเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อย สนิปส์เป็นความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง ปัจจุบันมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสนิปส์กับลักษณะทางคลินิกมากมาย ซึ่งอาจส่งผลถึงการ

แสดงออกของยีน ปริมาณและการทำงานของโปรตีน หรืออาจไม่ส่งผลกระทบใดๆ เลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของสโนปส์บนสายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งสโนปส์ได้เป็น 2 ประเภทคือ

(1) สโนปส์ที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (Non-coding SNP) ได้แก่

(1.1) Regulatory SNP (rSNP) เป็นสโนปส์ที่มีผลในการควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งบ่อยครั้งเกิดที่บริเวณโปรโมเตอร์ (Promoter region) ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในการสร้างโปรตีนให้มากขึ้นหรือลดลง

(1.2) สโนปส์ที่เกิดบริเวณรอยต่อระหว่างส่วนเอกซอนและอินทรอนที่เรียกว่า สไปลซิงไซต์ ทำให้การตัดต่ออาร์เอ็นเอผิดไปจากเดิม ส่งผลให้จำนวนกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ผิดไป

(1.3) Intronic SNP (iSNP) เป็นสโนปส์ที่เกิดบริเวณส่วนของอินทรอนจึงมักไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดที่สำคัญ

(2) สโนปส์ที่เกิดขึ้นในส่วนที่มีการถอดรหัส (Coding SNP) ได้แก่

(2.1) Non-synonymous SNP คือ SNP ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 3 ตัวที่ใช้ในการแปลรหัสกรดอะมิโน Triplet codon) จึงก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน

(2.2) Synonymous SNP คือ SNP ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 3 ตัวที่ใช้ในการแปลรหัสกรดอะมิโนแล้วไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน

### การศึกษาความสัมพันธ์บนยีน *COMT*

การศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุกรรมกับโรคมะเร็ง 2 รูปแบบ คือ การศึกษา Population-based case control study เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Genetic marker กับโรคโดยเปรียบเทียบความถี่ของแอลลีลและจีโนไทป์ ในประชากรที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือประชากรปกติ ส่วนการวิเคราะห์ Family-based study ศึกษาการถ่ายทอดของแอลลีลว่ามีแอลลีลไหนถ่ายทอดมากกว่าแบบสุ่มจากพ่อหรือแม่มายังลูกที่เป็นโรค

#### Population-based case control study

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker) ที่จำเพาะกับผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งกลุ่มควบคุมควรจะต้องมีเพศ ชนชาติใกล้เคียงกัน มีขนาดตัวอย่างที่เหมาะสม หากการเลือกกลุ่มควบคุมที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและแฝงอยู่ในประชากรที่ศึกษาโดยไม่ทราบมาก่อน (Population stratification) อาจทำให้ผลการทดสอบมีกำลังลดลง ซึ่งกำลัง (Power) เป็นความน่าจะเป็นของความถูกต้องของการทดสอบความสัมพันธ์และทำการตรวจสอบฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะสมดุล (Hardy-Weinberg

equilibrium: HWE) ข้อกำหนดสภาวะสมดุลของฮาร์ดี-ไวเบอร์ก คือ ประชากรต้องมีขนาดใหญ่ มีการแต่งงานอย่างสุ่มระหว่างสมาชิกของประชากร และการถ่ายทอดลักษณะต้องเป็นไปตามกฎของเมนเดล ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน (Mutation) การคัดเลือก (Selection) การอพยพ (Migration) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโดยบังเอิญ (Genetic drift)

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมกับผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบความถี่ของแอลลีล จีโนไทป์ กับกลุ่มควบคุม (Allahabadia and Gough, 1999; Heward et al., 1998) ทดสอบความสัมพันธ์ด้วยวิธีของเพียร์สัน (Pearson test) เป็นการเปรียบเทียบข้อมูลเชิงกลุ่ม (Categorical data) ใช้การวิเคราะห์ด้วยไคสแควร์ (Chi-square analysis) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า P-value ที่ได้ต้องน้อยกว่า 0.05 ( $P < 0.05$ ) จึงจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติในการศึกษาจะใช้โปรแกรม PLINK (Purcell et al., 2007) สำหรับการวิเคราะห์ซึ่งจะรับคำสั่งผ่าน Command Prompt

### **Family-based study**

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในครอบครัวเป็นวิธีการที่ไม่มีข้อผิดพลาดจากการเลือกกลุ่มควบคุม การวิเคราะห์จะศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของแอลลีลจากบิดามารดามายังลูกที่เป็นโรค (Transmitted: T) เปรียบเทียบกับแอลลีลจากบิดามารดาที่ไม่ได้ถ่ายทอดเป็นกลุ่มควบคุม (Not Transmitted: NT) (Heward et al., 1998) ใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดยีนที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคได้และมีการใช้วิธีนี้อย่างแพร่หลายในการศึกษาโรคที่มีความซับซ้อน (Complex disease) ในการศึกษาจะใช้โปรแกรม PLINK (Purcell et al., 2007) สำหรับการวิเคราะห์ซึ่งจะรับคำสั่งผ่าน Command Prompt

การวิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
Population-based case control study	<ul style="list-style-type: none"> <li>● การเก็บตัวอย่างทำได้ง่าย รวดเร็วกว่าการศึกษาในครอบครัว</li> <li>● เป็นวิธีที่มีความไวสูงในการค้นหายีนที่มีผลในการก่อโรคเพียงเล็กน้อยเหมาะในการค้นหาในในกลุ่มโรคที่เป็น Complex diseases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ถ้าพบความสัมพันธ์ก็ไม่สามารถบอกได้อย่างแน่ชัดว่าเครื่องหมายพันธุกรรมนั้นเป็นสาเหตุโดยตรงต่อการเกิดโรคหรือเป็นเพราะเครื่องหมายทางพันธุกรรมนั้นมี Linkage Disequilibrium กับยีนอื่นที่ก่อโรคอีกที่หนึ่ง ดังนั้นการศึกษาวิธีนี้มักจะเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็น Candidate gene ที่ทราบหน้าที่ชัดเจนที่สามารถอธิบายการเกิดโรคได้</li> <li>● สามารถพบผลบวกปลอมได้จาก Population stratification ถ้าตัวอย่างมีขนาดเล็กเกินไป</li> </ul>
Family-based study	<ul style="list-style-type: none"> <li>● สามารถค้นหายีนที่มีผลในการก่อโรคเพียงเล็กน้อยหรือปานกลางได้</li> <li>● ลดปัญหาผลบวกปลอมจาก Population stratification</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● วิธีนี้ต้องเลือกศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็น Candidate gene และต้องทราบตำแหน่งที่ของ Polymorphism ภายในยีนนั้นๆ</li> </ul>

### การศึกษาสไนป์แฮพลไทป์ (Haplotype) ด้วยโปรแกรม Haploview

โปรแกรมแฮพลิว (Haploview) ใช้ในการวิเคราะห์ผลสถิติทางด้านพันธุศาสตร์จากข้อมูลจีโนไทป์ของตัวอย่างแต่ละราย โปรแกรมสามารถแสดงค่าทางสถิติได้หลายรูปแบบ เช่น ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity) ค่าฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะสมดุล (Hardy-Weinberg equilibrium: HWE) ร้อยละของจีโนไทป์และความถี่ของแอลลีลที่พบน้อย (Minor allele frequency) อีกทั้งศึกษา Linkage disequilibrium (LD) ของตำแหน่งสไนป์แต่ละตำแหน่งในแต่ละยีนและตำแหน่งสไนป์ว่ามีสไนป์ตั้งกล่าวอยู่ใน LD บล็อกเดียวกันหรือไม่ หรือมีการถ่ายทอดไปด้วยกันหรือไม่ เพื่อดูความสัมพันธ์ของสไนป์ที่สัมพันธ์กับการเกิดกลุ่มอาการหรือไม่ โปรแกรมแฮพลิวเป็นโปรแกรมที่ทำงานได้กับข้อมูลที่ผู้ใช้งานดาวน์โหลดมาจาก

HapMap project และจาก Perlegen Genotype Browser โปรแกรมสามารถทำงานได้กับข้อมูลที่มีจำนวนสニป์หลายพันตำแหน่งขึ้นกับหน่วยความจำของเครื่อง

### การศึกษาการทำงานของโปรตีน COMT

การศึกษาของ O'Brien และคณะ (1976) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ COMT ในเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่พบความแตกต่างของกิจกรรมของเอนไซม์ COMT ระหว่างสองกลุ่มที่ศึกษาเช่นเดียวกับ การศึกษาของ Giller และคณะ (1980) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ COMT ในผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 5 ราย จากการนำเอาเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมาทดสอบซึ่งผลการทดสอบพบว่าค่า Activity เฉลี่ยที่วัดได้ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมกับกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันและเมื่อศึกษาค่า Activity จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงกับเม็ดเลือดแดงที่วัดค่า Activity ในผู้ป่วยรายเดียวกันพบว่าผลที่ได้ค่า Activity ของ COMT ให้ผลไม่แตกต่างกัน

### การศึกษาความสัมพันธ์บนยีน COMT ของสนิป์ตำแหน่ง rs4680

การศึกษาส่วนใหญ่มักศึกษาความสัมพันธ์ของสนิป์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน COMT ตำแหน่งโคดอน 158 จากรูปแบบโปรตีน MB-COMT และตำแหน่งโคดอน 108 จากรูปแบบโปรตีน S-COMT มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จากกวานีน (G) เป็นอะดีนีน (A) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากวาลีน (Valine) เป็นเมทไทโอนีน (Methionine) สามารถเขียนได้เป็น Val(G)/Met(A) ที่อยู่บริเวณเอกซอน 4 เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนเป็น Functional polymorphism ความแตกต่างการทำงานของโปรตีน COMT สูงถึง 3-4 เท่า หากมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากวาลีนเป็นเมทไทโอนีน เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของโดปามีนและนอร์อิพิเนฟรินทำให้การทำงานของโปรตีน COMT ไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร การศึกษาส่วนใหญ่พบสนิป์ตำแหน่งดังกล่าวเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคทางระบบประสาท ส่งผลให้ผู้ป่วยมีพฤติกรรมที่ผิดปกติ (Hosak, 2007)

การศึกษาความสัมพันธ์บนยีน COMT กับผู้ป่วยออทิซึมมีอยู่น้อยมาก การศึกษาส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษายีนอื่นๆ ร่วมกับยีน COMT โดย

(1) การศึกษาของ Yirmiya และคณะ (2001) ศึกษาความสัมพันธ์บนยีน COMT ร่วมกับยีนอื่นๆ ในผู้ป่วยออทิซึมโดยผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างจากการถ่ายทอดแอลลีล A และแอลลีล G ของพ่อและแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสนิป์ตำแหน่ง rs4680

(2) การศึกษาของ James และคณะ (2006) พบแอลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม (53%) และกลุ่มควบคุม (46%) โดยพบว่าจะมีโอกาสพบแอลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม ประมาณ 1.31 เท่า (Odd ratio) ของกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ จีโนไทป์ GG ในผู้ป่วยออทิซึม (29%) มากกว่าพบในกลุ่มควบคุม (20%) และโอกาสที่พบจีโนไทป์ GG ในผู้ป่วยสูงถึงประมาณ 1.74 เท่าของกลุ่มควบคุม

(3) การศึกษาของ Gadow และคณะ (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ของสนิปส์ ตำแหน่งดังกล่าวในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมที่มีลักษณะพฤติกรรมแบบชนสมาธิสั้น (ADHD) กลัวการปฏิสัมพันธ์ทางสังคม (Social phobia) วิตกกังวล (Anxiety) และอาการกระตุก (Tics) ตามลักษณะทางคลินิกร่วมโดยการประเมินเป็นคะแนนมาตรฐาน (CSI-4, Child Symptom Inventory-4) จากการสอบถามประวัติบิดามารดาและอาจารย์ที่โรงเรียน เปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมตามจีโนไทป์ GG (Met158-) กับกลุ่มจีโนไทป์ AA หรือ GA (Met158+) พบกลุ่ม Met158+ มีค่าเฉลี่ยของคะแนน social phobia สูงกว่ากลุ่ม Met158- (1.9 vs 0.8) ด้วยค่า นัยสำคัญทางสถิติใกล้ 0.05 ( $P = 0.06$ )

นอกจากนี้ยังพบว่ามิงงานวิจัยต่างๆ มากมายได้ศึกษาสนิปส์ตำแหน่ง rs4680 ในกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติของพัฒนาการทางสมองหรือระบบประสาท เช่น

(1) การศึกษาในกลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำ ผู้ป่วยมีอาการย้ำคิด (Obsession) และย้ำทำ (Compulsive) จะกระทำการหนึ่งสิ่งใดซ้ำๆ โดยไม่รู้เหตุผล ออทิสซึมมักมีลักษณะทางคลินิกคล้ายกับกลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำนั้นได้ พบว่าจีโนไทป์ AA ที่มีกิจกรรมลดลงจะมีความสัมพันธ์เสี่ยงต่อเพศชายที่เป็นโรคย้ำคิดย้ำทำ (Karayiorgou et al., 1997; 1999) รายงานนี้เป็นการค้นเริ่มต้นของยีน COMT ที่จะเป็นหลักฐานอธิบายถึงความสัมพันธ์ของยีนกับลักษณะของฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับโรคทางจิต เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ไม่ได้พบความสัมพันธ์ของยีน COMT กับการศึกษาในโรคจิตเภท (Daniels et al., 1996) หรือโรคไบโพลาร์ (Bipolar disorder; Gutierrez et al., 1997) ส่วนการศึกษาของ Alsobrook และคณะ (2002) วิเคราะห์แบบ TDT เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำและยีน COMT ใน 56 ครอบครัว โดยพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญของแอลลีล A ในกลุ่มผู้หญิงที่เป็นกลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำแต่ไม่พบความสัมพันธ์ในกลุ่มเพศชาย

(2) การศึกษาในกลุ่มอาการจิตเภท (Schizophrenia: SCZD) ผู้ป่วยมีลักษณะอาการประสาทหลอน หลงผิด มีความผิดปกติทางอารมณ์และความคิด ยีน COMT เป็น Candidate gene ของกลุ่มอาการทางจิตเภทเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของโดปามีนและยังเกี่ยวข้องกับโรค VCFs (Velocardio-facial syndrome) หรือรู้จักในชื่อของ DiGeorge Syndrome เนื่องจากอยู่บนตำแหน่งของ 22q11.2 การขาดหายของตำแหน่ง 22q11.2 มียีนประมาณ 30-40 ยีน รวมทั้งยีน COMT ซึ่งจากการหายไปทำให้คนเป็นโรคมียีนเพียงแอลลีลเดี่ยว แทนที่จะมี 2 แอลลีล ตามปกติ จากการศึกษาก่อนหน้าของ Weksberg และคณะ (2007) พบการขาด

หายไประยะสั้น *COMT* รวมอยู่ด้วยและการศึกษาสไนป์ตำแหน่ง rs4680 เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมที่รุนแรงและก้าวร้าวในผู้ป่วยกลุ่มอาการจิตเภท (Hosak, 2007) การศึกษาแบบ Family-based study เพื่อดูการถ่ายทอดแอลลีล พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการถ่ายทอดแอลลีล G มาสู่ผู้ป่วยมากกว่าแอลลีล A (Li et al., 2000; Egan et al., 2001) การศึกษาของ Chen และคณะ (2004) ศึกษาเอ็มอาร์เอ็นเอ โพรตีน และการทำงานของเอนไซม์ *COMT* จากส่วนของเนื้อเยื่อสมองและเลือด พบว่าจีโนไทป์แบบ GG มีการทำงานของเอนไซม์ *COMT* มากกว่าจีโนไทป์แบบ AA นอกจากนี้ยังมีความคงตัวของโพรตีน *COMT* ในผู้มีจีโนไทป์แบบ GG ที่มีกรดอะมิโนแบบวาลีนสูงกว่าแบบเมไทโอนีน ทำให้การทำงานของโพรตีน *COMT* มีประสิทธิภาพมาก

(3) การศึกษาในกลุ่มชนสมาธิสั้น (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: ADHD) เป็นภาวะที่พบร่วมกับกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมได้บ่อย (ประมาณร้อยละ 50) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแอลลีล G มากกว่าแอลลีล A ในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Caspi et al., 2008)

จากผลการศึกษาสรุปในเบื้องต้นว่าสไนป์ตำแหน่ง rs4680 มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของโพรตีน *COMT* การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจะไปลดความคงตัวของเอนไซม์ *COMT* ต่อความร้อนและลดประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ *COMT* ทำให้มีผลต่อระดับของสารสื่อประสาทต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการจดจำ อารมณ์และกลุ่มอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือสไนป์บนยีน *COMT* ที่ตำแหน่งอื่นๆ ต่อไป เพื่อนำมาอธิบายผลต่อความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของพัฒนาการทางสมองหรือระบบประสาท

### การศึกษาความสัมพันธ์บนยีน *COMT* กับสไนป์ตำแหน่งอื่น ๆ

การศึกษาบทความวิจัยในส่วนนี้อาจจะเป็นแนวทางต่อไปสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างออทิซึมสเปกตรัมและสไนป์ตำแหน่งอื่นๆของยีน *COMT* เนื่องจากยีน *COMT* เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมของสารสื่อประสาท จึงมีการศึกษายีน *COMT* ในโรคจิตเวชและพฤติกรรมของคนอย่างมากมาย โดยการศึกษายีน *COMT* ส่วนใหญ่มักศึกษาสไนป์ตำแหน่ง rs4680 ดังที่กล่าวไปแล้ว แต่บางรายงานได้ศึกษาสไนป์ตำแหน่งอื่นๆด้วย เช่น

(1) Li และคณะ (2000) ศึกษาครอบครัวกลุ่มอาการจิตเภทชาวจีน 198 ครอบครัว โดยใช้สไนป์แอสโทปไทป์ 4 ตำแหน่งของยีน *COMT* ร่วมกับสไนป์ในยีน *ARVCF* ซึ่งอยู่บริเวณโครโมโซม 22q11 สไนป์ที่ศึกษาคือ ตำแหน่ง -287 บริเวณโปรโมเตอร์ของ *MB-COMT* ตำแหน่ง 186 (rs4633) บริเวณเอกซอน 3 ตำแหน่ง 472 (rs4680) บริเวณเอกซอน 4 และตำแหน่ง 900 บริเวณเอกซอน 6 ของยีน *COMT* และสไนป์ตำแหน่ง 930 ของยีน



ARVCF การศึกษาพบว่ามีการถ่ายทอดสปีส์แฮโพลไทป์แบบ G: C: G: insC: C ดังกล่าวจากพ่อแม่มาสู่ผู้ป่วยมากกว่าสปีส์แฮโพลไทป์แบบอื่น

(2) Shifman และคณะ (2002) ศึกษาความสัมพันธ์สปีส์ 12 ตำแหน่งของยีน COMT พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสปีส์ตำแหน่ง 3 ตำแหน่งคือ rs165688, rs165599 และ rs737865 ในกลุ่มผู้ป่วยอาการทางจิตเภทจำนวน 714-724 รายกับกลุ่มควบคุมจำนวนมากกว่า 2,000 - 4,014 ราย (ขึ้นกับสปีส์ที่ศึกษา) และพบความแตกต่างของความถี่สปีส์แฮโพลไทป์แบบ G: G: G ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม

(3) Lee และคณะ (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ของสปีส์ 17 ตำแหน่งของยีน COMT ในกลุ่มอาการจิตเภทชาวเกาหลี 320 ราย (ผู้ชาย 167 ราย/ผู้หญิง 153 ราย) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 379 ราย (ผู้ชาย 192 ราย/ผู้หญิง 187 ราย) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสปีส์ตำแหน่ง rs6267 (p.A72S หรือ p.A22S ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนอะลานีนเป็นเซอรีนที่ตำแหน่งโคดอน 72 ในรูปแบบโปรตีน MB-COMT หรือตำแหน่งโคดอน 22 ในรูปแบบโปรตีน S-COMT) เมื่อเปรียบเทียบจีโนไทป์ GG กับจีโนไทป์ GT/TT พบว่าจีโนไทป์ GT/TT ในผู้ป่วยทั้งหมด (21.6%) มากกว่ากลุ่มควบคุมทั้งหมด (13.2%) และมีโอกาสพบจีโนไทป์ GT/TT ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดประมาณ 1.82 เท่า (Odd ratio) ของกลุ่มควบคุมและแอลลีล T (กรดอะมิโนเซอรีน) น่าจะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดอาการทางจิตเภทโดยเฉพาะในผู้ป่วยเพศหญิง เพราะเมื่อแยกพิจารณาตามลักษณะเพศของผู้ป่วยพบว่ามี ความแตกต่างของแอลลีล T ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิง (13%) และกลุ่มควบคุมเพศหญิง (7%) แต่ไม่พบในผู้ป่วยเพศชาย

ตารางที่ 1 สรุปการศึกษาความสัมพันธ์ของสไนป์บนยีน *COMT* จากรายงานการศึกษาในกลุ่มอาการจิตเภท และการศึกษาอื่นๆ ที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตำแหน่งที่ศึกษา	สไนป์	แอลลีล	การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน	เอกสารอ้างอิง	กลุ่มประชากร	ลักษณะหรือโรคที่ศึกษา
5' UTR	rs2097603	A/G	-	Meyer-Lindenberg et al., 2006	ยุโรป	หน้าที่บนยีน <i>COMT</i> ต่อสมองมนุษย์
				Funke et al., 2005	ยุโรป	โรคทางจิต (psychotic)
อินทรอน 1	rs737865	C/T	-	Shifman et al., 2002	อิสราเอล	กลุ่มอาการทางจิตเภท
				Meyer-Lindenberg et al., 2006	ยุโรป	หน้าที่บนยีน <i>COMT</i> ต่อสมองมนุษย์
				Funke et al., 2005	ยุโรป	โรคทางจิต (psychotic)
อินทรอน 2	rs6269	A/G	-	Lee et al., 2005	เกาหลี	กลุ่มอาการทางจิตเภท
				Shifman et al., 2002	อิสราเอล	กลุ่มอาการทางจิตเภท
เอกซอน 3	rs6267	G/T	Ala/Ser	Lee et al., 2005	เกาหลี	กลุ่มอาการทางจิตเภท
เอกซอน 4	rs4680	G/A	Val/Met	Karayorgou et al., 1997, 1999	ยุโรป	กลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำ
				Schindler et al., 2000	แคนาดา	กลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำ
				Niehaus et al., 2001	แอฟริกา	กลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำ
				Alsobrook et al., 2002	ยุโรป	กลุ่มอาการย้ำคิดย้ำทำ
				Li et al., 2000	ยุโรป	กลุ่มอาการทางจิตเภท
				Egan et al., 2001	ยุโรป	กลุ่มอาการทางจิตเภท
				Shifman et al., 2002, 2003	ยิว	กลุ่มอาการทางจิตเภท
				Baker et al., 2005	อังกฤษ	กลุ่มอาการทางจิตเภท
				James et al., 2006	สหรัฐอเมริกา	ออทิซึมสเปกตรัม
				Beuten et al., 2006	อเมริกา	กลุ่มอาการทางจิตเภท
Funke et al., 2005	ยุโรป	โรคทางจิต (psychotic)				
เอกซอน 6	rs12814	A/G	-	Lee et al., 2005	เกาหลี	กลุ่มอาการทางจิตเภท
3' UTR	rs165599	A/G	-	Shifman et al., 2002	อิสราเอล	กลุ่มอาการทางจิตเภท
				Meyer-Lindenberg et al., 2006	ยุโรป	หน้าที่บนยีน <i>COMT</i> ต่อสมองมนุษย์
				Funke et al., 2005	ยุโรป	โรคทางจิต (psychotic)

### หลักการออกแบบไพรเมอร์ (Dieffenbach et al., 1993)

1. ควรเลือกตำแหน่งที่อยู่ขนาบข้างดีเอ็นเอต้นแบบ ที่ต้องการทำการสังเคราะห์ โดยตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้งสองเส้นควรมีระยะห่างกัน 150 – 1,000 คู่เบส และลำดับเบสที่ตำแหน่งนี้ควรมีการกระจายแบบสุ่มไม่ควรเลือกบริเวณที่มีการเรียงตัวซ้ำๆ กันของลำดับเบส เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้ไพรเมอร์สามารถไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างไม่จำเพาะ
2. ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกระจายของเบสต่างๆ เหมือนกับดีเอ็นเอต้นแบบ ควรจำนวนของ GC content มากกว่า 50% ไม่ควรเลือกที่มี GC content สูงเกินไป
3. ไพรเมอร์ควรมีความยาวประมาณ 17-30 นิวคลีโอไทด์
4. หลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มีเบสอะดีนีน (A) และเบสกวานีน (G) หรือไซโทซีน (C) และไทมีน (T) จำนวนมาก
5. หลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่อาจเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เช่น มีลักษณะ Hairpin หรือ Primer dimer โดยไพรเมอร์ทั้งสองเส้นจะต้องไม่มีปลายด้าน 3' ที่เข้าคู่สมกันคือต้องไม่จับกับลำดับเบสของตนเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีการเกิด Hairpin และเกิดการจับกันที่ปลาย 3' end ของไพรเมอร์

## วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *COMT* ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม

## บทที่ 2 วิธีการวิจัย

### วัตถุประสงค์

#### กลุ่มผู้ป่วย

กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมสเปกตรัมตามเกณฑ์ DSM-IV จำนวน 203 ราย ประกอบด้วย 2 กลุ่มคือ (1) ออทิสซึม (Autism disorder) 160 ราย และ (2) Pervasive Developmental Disorder-Not Otherwise Specified (PDD-NOS) ซึ่งมีอาการน้อยกว่าและไม่ครบตามเกณฑ์วินิจฉัยออทิซึม 43 ราย มีอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยทั้งหมดเท่ากับ  $51.72 \pm 26.59$  เดือน เพศชาย 169 ราย (ร้อยละ 83.3) และเพศหญิง 34 ราย (ร้อยละ 16.7) ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเชื้อชาติไทย (ตารางที่ 2) ผู้ป่วยทุกรายต้องไม่มีหน้าตาผิดปกติหรือเข้าได้กับกลุ่มอาการ (Syndrome) ใดอาการหนึ่งที่เป็นสาเหตุออทิซึม เช่น กลุ่มอาการโครโมโซมเอ็กซ์เปราะ โรคทูเบอร์รัส สโครโรซิส กลุ่มอาการเรตต์ เป็นต้น

ผู้ป่วยได้รับการตรวจและวินิจฉัยโดยกุมารแพทย์ด้านพัฒนาการเด็กจากคณะแพทยศาสตร์ 3 สถาบัน คือ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์และโรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล โครงการวิจัยผ่านการอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยจากทั้ง 3 สถาบัน

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (N=203)

โรงพยาบาล	ออทิซึม		PDD-NOS		รวม (ราย)
	เพศชาย (ราย)	เพศหญิง (ราย)	เพศชาย (ราย)	เพศหญิง (ราย)	
สงขลานครินทร์	28	10	9	0	47
รามธิบดี	59	9	25	5	98
ธรรมศาสตร์	45	9	3	1	58
รวม	132	28	37	6	203

## การเลือกผู้ป่วยในการศึกษา

การเลือกตัวอย่างผู้ป่วยศึกษาเบื้องต้นผู้ป่วยต้องผ่านการตรวจกรองไม่มีความผิดปกติของโครโมโซม ความผิดปกติของการผ่าเหล่าของยีนเออาร์เอกซ์ กลุ่มอาการเรตต์ กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ ไม่มีปัญหาการคลอดและปัญหาสุขภาพในช่วงปริกำเนิด น้ำหนักแรกคลอดไม่ต่ำกว่า 2,000 กรัม และไม่เป็นการคลอดก่อนกำหนด โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการการตรวจกรองและการศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุกรรมในผู้ป่วยไทยที่เป็นออทิซึม (รูปที่ 4)

การศึกษารั้งนี้ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1. การตรวจกรองโครโมโซมผิดปกติในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมด้วยเทคนิค GTG-banding จำนวน 203 ราย คือทุกรายที่เข้าโครงการ ส่วนการตรวจกรองยีนอื่นๆ เป็นการศึกษาในชุดโครงการอยู่แล้ว

2. การตรวจกรองการกลายพันธุ์ (Mutation screening) ยีน *COMT* โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม ตามเกณฑ์การเลือกผู้ป่วย 173 ราย มีอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยทั้งหมดเท่ากับ  $51.68 \pm 27.03$  เดือน เพศชาย 143 ราย (ร้อยละ 82.7) และเพศหญิง 30 ราย (ร้อยละ 17.3) ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเชื้อชาติไทย (ตารางที่ 3) เกณฑ์การเลือกผู้ป่วยคือ ผู้ป่วยที่มีประวัติครอบครัวผิดปกติด้านใดด้านหนึ่งหรือหลายด้าน\* กลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับสติปัญญาน้อยกว่า 80 จากแบบทดสอบไม่ใช้ภาษา (Non-verbal IQ, Stanford Binet version 5) และกลุ่มผู้ป่วยที่มีพฤติกรรมกรับตัวในสังคมอยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่าอายุตามแบบทดสอบ Vineland ตรวจกรองยีน *COMT* ทั้ง 6 เอกซอน เพื่อดูว่ามี การกลายพันธุ์หรือไม่ มีการเปลี่ยนแปลงแบบใหม่ (New variants) หรือสลิปส์ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้จากฐานข้อมูล แล้วจึงเลือกสลิปส์ที่น่าสนใจหรือที่เคยมีรายงานมาแล้วศึกษาความสัมพันธ์ต่อไป

\*ผู้ป่วยที่มีประวัติครอบครัวผิดปกติด้านใดด้านหนึ่งหรือหลายด้าน เช่น กลุ่มอาการออทิสติก (Autistic) พัฒนาการทางภาษาล่าช้า (Delay speech) ปัญหาการเรียน (Learning problem) ปัญหาสุขภาพจิตอื่นๆ (Psychiatric problem) และโรคลมชัก (Seizure)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์บนยีน *COMT* หลังจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม การวิเคราะห์แบบ Family-based study 160 ครอบครัว การวิเคราะห์แบบ Population-based case control study 188 รายและการศึกษาสลิปส์แอสโซซิเอชันด้วยโปรแกรม PLINK และ Haploview นอกจากนี้ได้ศึกษาในกลุ่ม

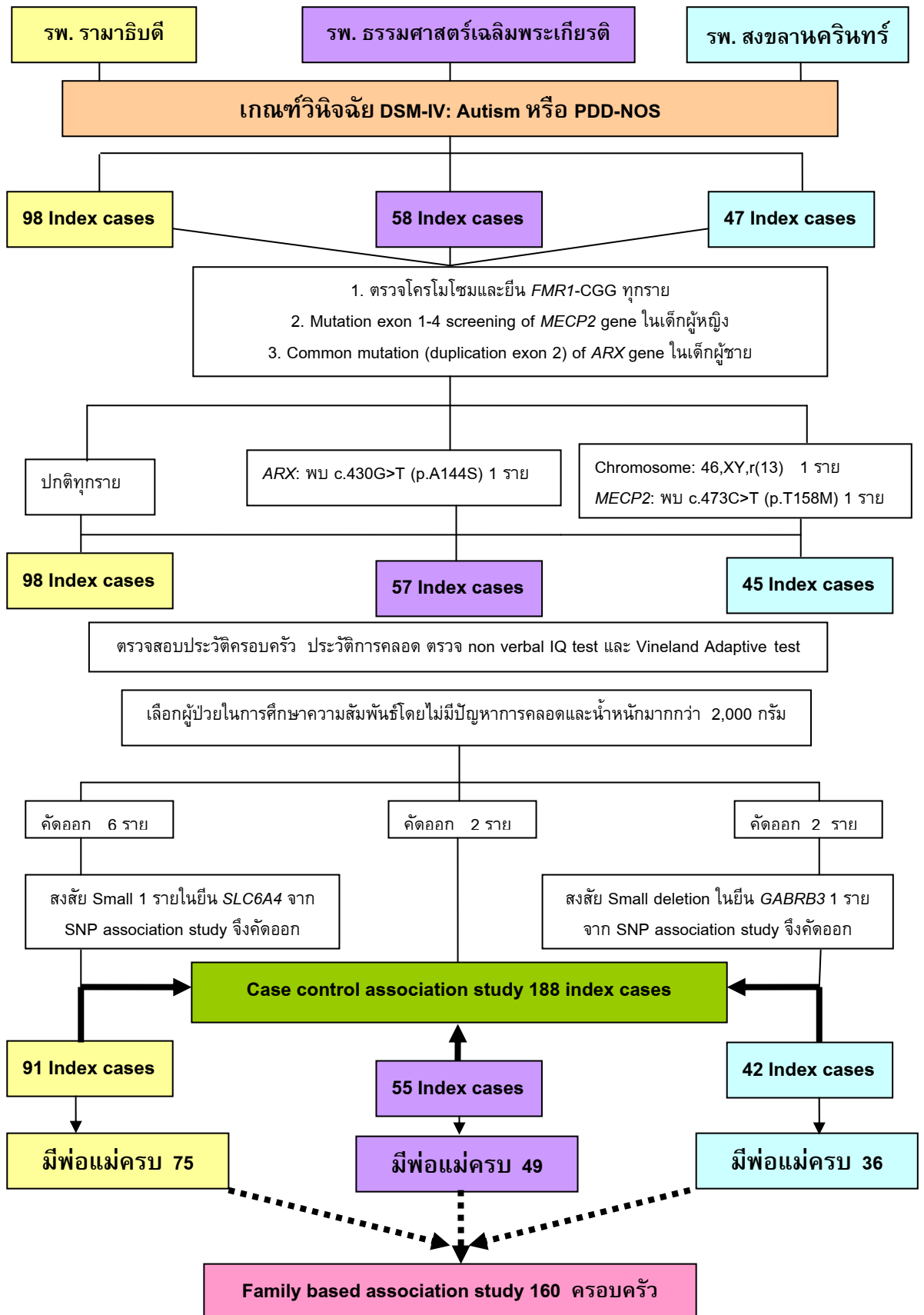
ย่อย 2 แบบ คือ ผู้ป่วยเพศชายและผู้ป่วยออกโทซิมตามเกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV (ไม่รวม PDD-NOS)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษาการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน COMT

โรงพยาบาล	เพศชาย (ราย)	เพศหญิง (ราย)	รวม (ราย)
สงขลานครินทร์	32	8	40
รามาริบัติ	73	14	87
ธรรมศาสตร์	38	8	46
รวม	143	30	173

### กลุ่มควบคุม

กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มประชากรปกติจากคลังเลือดของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์ และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 250 ราย ประกอบด้วย เพศชาย 178 ราย เพศหญิง 72 ราย จำนวนกลุ่มควบคุมจะต้องมีสัดส่วนของเพศและเชื้อชาติใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย กลุ่มควบคุมผ่านการชักประวัติเชื้อชาติและภูมิลำเนาของบรรพบุรุษใน 3 ชั่วรุ่น ปัญหาทางจิตเวช ความบกพร่องทางการเรียน การชักในครอบครัว ซึ่งกลุ่มควบคุมต้องไม่มีประวัติความผิดปกติดังกล่าว และไม่ต้องมีการจับคู่อายุระหว่างผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม (Age match) เพราะการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเลือดเกิดขึ้นน้อยมาก ซึ่งลักษณะของยีนที่ศึกษาจะไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุ



รูปที่ 4 แผนภาพแสดงการคัดเลือกและคัดกรองผู้ป่วย



## สารเคมี

Absolute Ethanol  
Acetic Acid  
Acrylamide/Bis Solution  
Agarose  
Ammonium Persulfate  
Betaine  
BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems)  
BigDye Sequencing Buffer (5X)  
Boric Acid  
Chloroform  
7-Deaza dGTP  
Dimethylsulfoxide (DMSO)  
Distilled Water  
dNTP Mix: dATP, dCTP, dGTP and dTTP  
Elution Buffer  
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)  
Ethidium Bromide (EtBr)  
Fetal Bovine Serum  
Hidi Formamide  
Giemsa Stain  
Glycerol  
Hydrochloric Acid (HCl)  
Isoamyl Alcohol  
Methanol  
Minimum Essential Medium (MEM)  
Magnesium Chloride (MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen)  
Metrotrexate (MTX)  
N-deacetyl-N-Methylcolchicine (colchicine)  
Nonidet P-40 (NP-40)

**สารเคมี (ต่อ)**

PCR Buffer, 10X (Invitrogen)

Phenol, saturated

Phytohemagglutinin (PHA)

Potassium Chloride (KCl)

Proteinase K

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640)

Sodium acetate

Sodium hydroxide (NaOH)

Lysis buffer

*Taq* DNA polymerase (Invitrogen)

TE Buffer

3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein (Bromophenol blue)

N,N,N',N'-Tetramethylethanediamine (TEMED)

Thymidine

Tris

Trypsin

## อุปกรณ์

เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex, Scientific)  
 เครื่องควบคุมอุณหภูมิชนิดแห้ง (Heat Block, Biosan/Latvia)  
 เครื่องถ่ายภาพยวี่ (Bioimaging system SynGene)  
 เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (3130 Genetic Analyzer, AB)  
 เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (PTC200, MJ Research)  
 เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (2720 Thermal cycler, AB)  
 เครื่องวัดเทียบสีของสารละลาย (Spectrophotometer, Ultrospec 1100pro)  
 เครื่องสำหรับแยกสารพันธุกรรมในแนวตั้ง (Verticle Electrophoresis, Minigel)  
 เครื่องสำหรับแยกสารพันธุกรรมในแนวนอน (Horizontal Electrophoresis, Gelmate 2000)  
 เครื่องหมุนเหวี่ยงสำหรับตัวอย่างขนาด 1.5-2.0 มิลลิลิตร (Centrifuge, 5415D Eppendorf)  
 เครื่องหมุนเหวี่ยงสำหรับตัวอย่างขนาด 30-50 มิลลิลิตร (Centrifuge, Model 5420 Kubota)  
 ตู้ดูดควันพิษ (Fume hood with carbon fillter)  
 ตู้บ่มเชื้อ (Air Incubator, incucell 111)  
 ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina Airflow Biological Safety Cabinet ClassII)  
 ตู้อบร้อน (Hot Air Oven, Oven Model ED 115)  
 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaker Water Bath)

## วิธีดำเนินการ

### การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วย บิดามารดาของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ตามที่ได้เซ็นในใบยินยอม (Informed consent) จากเส้นเลือดดำบริเวณแขน ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดปลอดเชื้อที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจะเก็บจำนวน 2 หลอด คือหลอด EDTA จำนวน 1 หลอด (EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร) และหลอดเฮปาริน (เฮปารินความเข้มข้น 0.1-0.2 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร) จำนวน 1 หลอด บิดามารดาผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมบรรจุหลอด EDTA 1 หลอด ผสมเลือดกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่เคลือบอยู่ในหลอดจากการกลับหลอดไปมาเบาๆ ลงบันทึกการเก็บตัวอย่างและปริมาตรตัวอย่างที่เก็บได้ โดยหลอดทดลองที่มีสารเฮปาริน จะนำไปตรวจกรองโครโมโซมผิดปกติในกลุ่มผู้ป่วย ส่วนหลอดทดลอง EDTA จะนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อการตรวจการผ่าเหล่าของยีนเออาร์เอกซ์ในผู้ป่วยเพศชาย ในผู้ป่วยเพศหญิงจะตรวจยีนกลุ่มอาการเรตต์ แต่ผู้ป่วยทุกรายที่ต้องเจาะเลือดอยู่แล้วตามข้อบ่งชี้จะได้ตรวจยีนของยีนโครโมโซมเอกซ์เปราะ ถ้าไม่พบความผิดปกติใดๆ จะนำไปตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *COMT* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดภาวะออทิซึมสเปคตรัมของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับถ่ายทอดความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมและกลุ่มควบคุมต่อไป

### การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

นำเลือดมาถ่ายลงหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติม TE buffer ให้ได้ปริมาตร 12-13 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และทำซ้ำอีกสองครั้งหรือจนกว่าเม็ดเลือดแดงของฮีโมโกลบินในเลือดจะหายไป นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอหรือเก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะสกัด

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาย่อยโดยการเติมสารช่วยย่อยเซลล์ ได้แก่ Lysis buffer (0.14 M NaCl, 0.01 M Tris pH8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, Nonidet P-40, dH<sub>2</sub>O) ปริมาตร 2,280 ไมโครลิตร 10% SDS ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และ 10mg/μl Proteinase K ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือจนกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวจะย่อยหมด เติมน้ำผสมของ Saturated phenol, Chloroform

และ Isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรเริ่มต้น กลับหลอดไปมา 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ควรหลีกเลี่ยงโปรตีนสีขาว ทำซ้ำอีกครั้งโดยเติมสารผสมของ Saturated phenol, Chloroform และ Isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรเริ่มต้น กลับหลอดไปมา 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมสารผสมของ Chloroform และ Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมเอธานอลบริสุทธิ์เย็น ปริมาตร 2 เท่า กลับหลอดเบาๆ จนกว่าจะเห็นดีเอ็นเอตกตะกอนแล้วเขี่ยเอาดีเอ็นเอที่ตกตะกอนโดยใช้ Autopipette tip ใส่หลอดปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีเอธานอลเย็นความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทเอธานอลทิ้ง จากนั้นจึงวางดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จึงเติม TE buffer ในปริมาตรที่เหมาะสม 100-300 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดเทียบสีของสารละลาย แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### การศึกษาโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

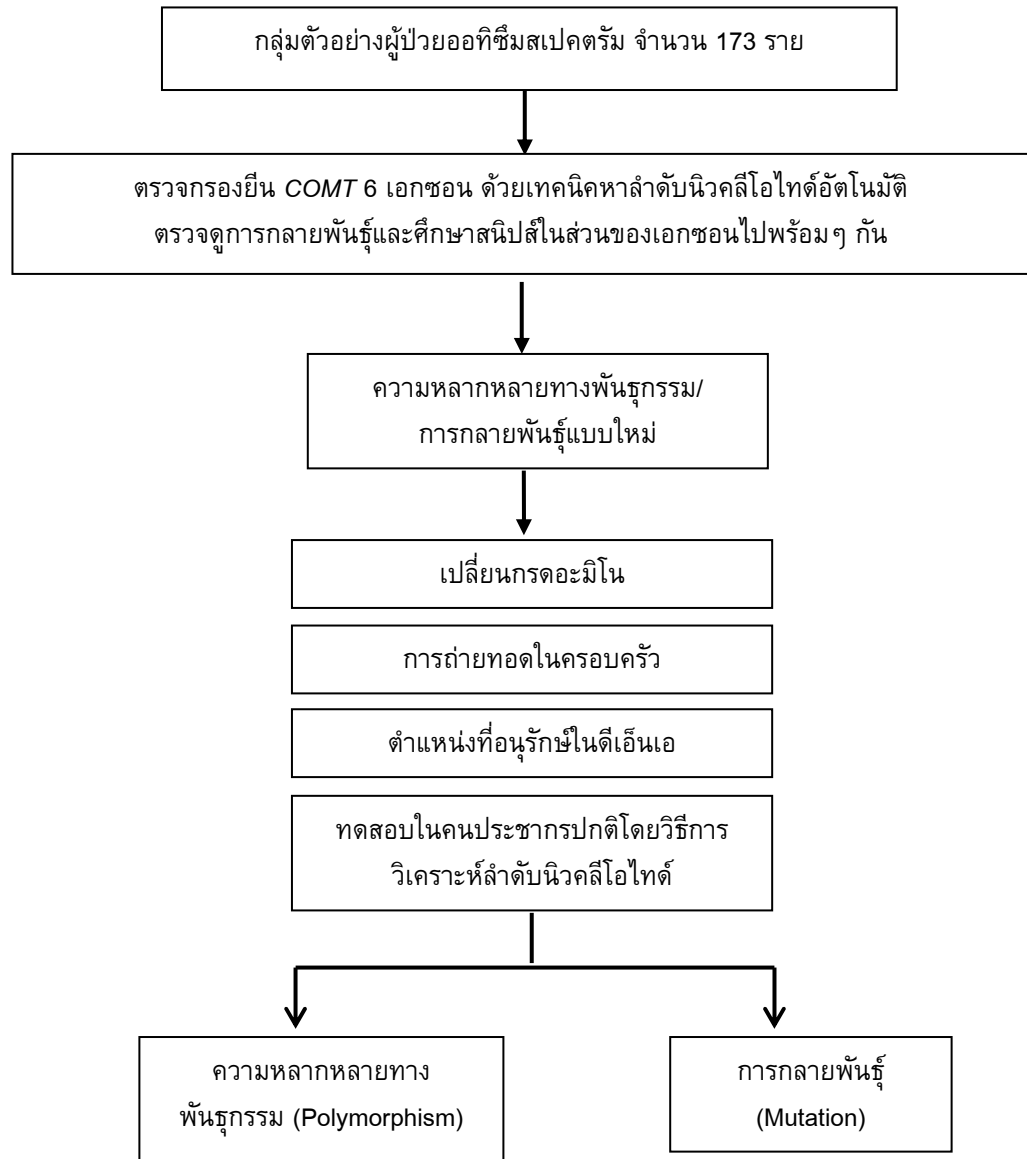
เพาะเก็บเลือดเด็กไทยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมสเปคตรัมตามเกณฑ์ DSM-IV จำนวน 203 ราย จากเส้นเลือดดำโดยใช้สารเฮปารินกันการแข็งตัวของเลือด ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำเม็ดเลือดขาวมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มีซีรัมของลูกวัว (Fetal bovine serum) ร้อยละ 10 เป็นส่วนประกอบและจากนั้นจึงเติม Phytohemagglutinin ซึ่งเป็นสารช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว เตรียมโครโมโซมให้มีความยาวที่เหมาะสมด้วยเทคนิคของ Emilie (1985) เพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวจะแบ่งครบวงจรที่หนึ่งในเวลา 48 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 48 เติมสาร Methotrexate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ S (DNA synthesis) และ 17 ชั่วโมงต่อมา นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายที่อยู่ด้านบนของตะกอนทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ปราศจากซีรัมปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดสารละลายที่อยู่ด้านบนของตะกอนทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มีซีรัมปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เติม Thymidine เพื่อหยุดการทำงานของ Methotrexate ให้สั้นที่สุดลง และนำเซลล์ไปบ่มต่อที่ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง 10 นาที เมื่อครบเวลาเติม Ethidium Bromide ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และบ่มต่ออีก 1 ชั่วโมง 45 นาที เมื่อครบเวลาเติม Colchicine ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล (Spindle Fiber) และบ่มเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายเหนือตะกอนทิ้ง ค่อยๆ เติม 0.075 M KCl ทำให้เซลล์พองขยายมากด้วยเกลือ ที่ละหยดจนครบ 7 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ค่อยๆ เติม Fresh Fixative (Methanol: Acetic acid อัตราส่วน 3: 1) เพื่อตรึงเซลล์ให้อยู่ในสภาพคงที่ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำส่วนที่อยู่เหนือตะกอนทิ้ง เติม Fresh Fixative ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และเติม Fresh Fixative ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในตู้เย็น 2-8 องศาอย่างน้อย 1 คืน การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์ได้พัฒนามาจากวิธีของ Moorhead และคณะ (1960) และย้อมแถบสีโครโมโซมด้วยวิธี GTG-banding ตามวิธีของ Seabright (1971) ในรายที่มีโครโมโซมผิดปกติหรือสงสัยว่าผิดปกติจะย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิคพิเศษเพิ่มเติม เช่น C-banding (Sumner, 1972), NOR-banding (Bloom and Goodpasture, 1976) และ QFQ-banding (Caspersson et al., 1970) การรายงานผลโครโมโซมยึดตามแบบของ ISCN 2009 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009, Shaffer and Tommerup, 2009)

### การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *COMT*

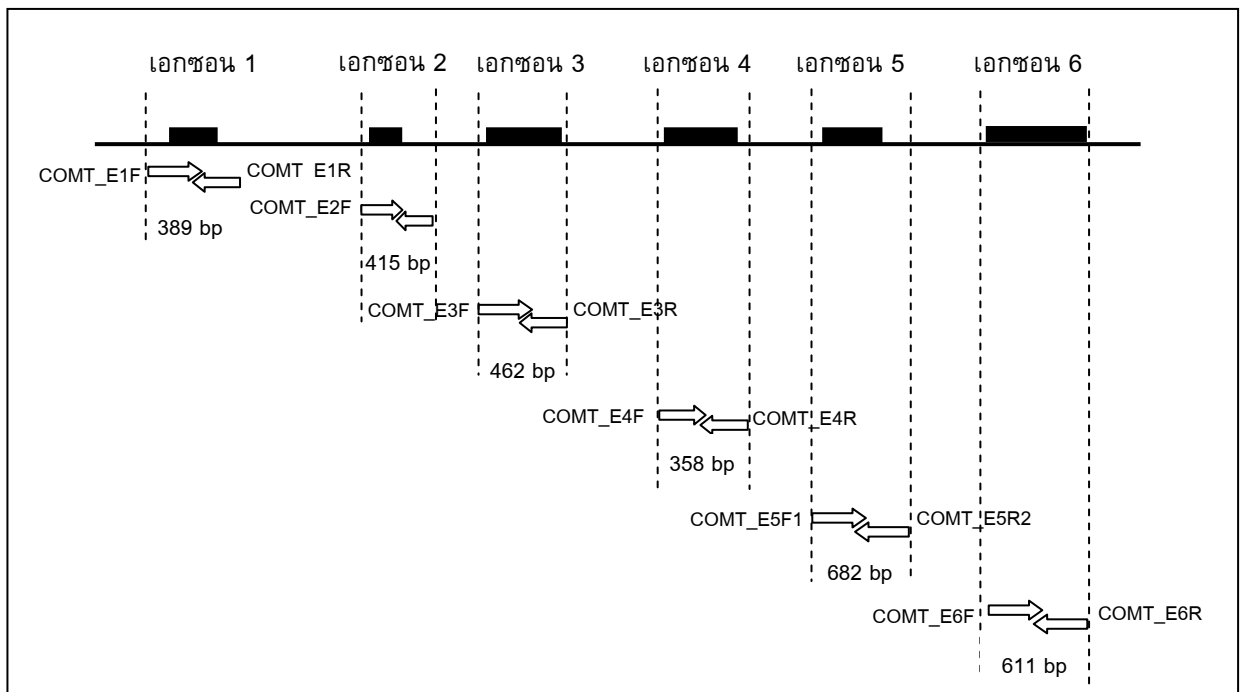
การศึกษาคณะจะตรวจกรองลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COMT* ตรวจกรองทั้งหมด 6 เอกซอน เพื่อตรวจดูการกลายพันธุ์และศึกษาสปีส์ในส่วนของเอกซอนไปพร้อมๆ กันในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม การตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน *COMT* ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก คือ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยการทำให้ซ้ำ (Polymerase chain reaction) ทั้ง 6 เอกซอน การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ (Purification) และนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI PRISM 3130 DNA sequencer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับแหล่งข้อมูลธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรมบลาสต์ (BLAST) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่พบเป็นการกลายพันธุ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรม (รูปที่ 5)

รูปที่ 5 แสดงการตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน *COMT* ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม



### การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ ยีน *COMT* ประกอบด้วย 6 เอกซอน การทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจึงแยกได้เป็น 6 ส่วนเช่นกัน (รูปที่ 6) โดยไพรเมอร์ทั้ง 6 เอกซอน (ตารางที่ 4) มาจากการออกแบบด้วยโปรแกรม Vector NTI การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอครอบคลุมในส่วนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนและส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 10 ไมโครลิตรของทุกเอกซอน ประกอบด้วย 1X PCR buffer  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 1.0-1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละคู่เป็น 0.25-0.5 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมและ 0.5 ยูนิต *Taq* DNA polymerases (Invitrogen) และการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบางตำแหน่งมีการนำสาร adjuvant ได้แก่ DMSO, Betaine และ Q solution มาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 5) และสภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (ตารางที่ 6) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์แยกด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นจึงทำให้บริสุทธิ์เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับปฏิกิริยาวิเคราะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



**รูปที่ 6** แสดงตำแหน่งการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ยีน *COMT* ที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่และส่วนที่เป็น Exon-intron boundary แสดงไว้ในส่วนของภาคผนวก (รูปที่ 68)



**ตารางที่ 4** แสดงไพรเมอร์สำหรับการทำพีซีอาร์การตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน *COMT* ทั้งหมด 6 เอกซอน

เอกซอน	ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์ (5'-3')	จำนวนเบส
เอกซอน 1	COMT_E1F	ACCCCATCCTACCTGCTGC	19
	COMT_E1R	TCCGAATTCCCCAGTCCCATCC	23
เอกซอน 2	COMT_E2F	GCCTTCTGCTGTCTCTTCTGAGG	23
	COMT_E2R	ATGCGGACACCAGGCTTCTAGG	22
เอกซอน 3	COMT_E3F	GATGGTGGCACTCCAAGCAAAG	22
	COMT_E3R	GGGGTGATAACAGCTTCTCCTGT	23
เอกซอน 4	COMT_E4F	TCCAAGTCCCCTCTCTCCACCT	23
	COMT_E4R	CAGTGAACGTGGTGTGAACACCT	23
เอกซอน 5	COMT_E5F1	TCTCACAGCTCTGGGTAAACTGCC	24
	COMT_E5R2	TCCTTGGTCTGTGCCGTTTCTGC	24
เอกซอน 6	COMT_E6F	TGGTTTGGGGCAGGTTCTCTGG	22
	COMT_E6R	AAGTCAAGGGCAGCAGGGGAATGG	24

**ตารางที่ 5** แสดงส่วนประกอบและสภาวะสำหรับการทำพีซีอาร์การตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน *COMT*

เอกซอน	ชื่อไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ( $\mu\text{M}$ )	ความเข้มข้นของ $\text{MgCl}_2$ (mM)	Annealing temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Product size (bp)
เอกซอน 1	COMT_E1F	0.50	1.5	61	389
	COMT_E1R				
เอกซอน 2	COMT_E2F	0.25	1.5	66	415
	COMT_E2R				
เอกซอน 3	COMT_E3F	0.25	1.25	60	462
	COMT_E3R				
เอกซอน 4	COMT_E4F	0.25	1.0	60	358
	COMT_E4R				
เอกซอน 5	COMT_E5F1	0.25	1.5	64	682
	COMT_E5R2				
เอกซอน 6	COMT_E6F	0.25	1.5	62	611
	COMT_E6R				

ตารางที่ 6 แสดงสภาวะสำหรับทำพีซีอาร์การตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน COMT

ขั้นตอน	เอกซอน 1 - 6		
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	95	5 นาที	35
Denaturation	95	30-60 วินาที	
Annealing	60-66	30-60 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	

### การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis)

ขั้นแรกเป็นการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีลักษณะเป็นเจลแผ่น (Slap gel) เตรียมกระจกโดยการเช็ดทำความสะอาดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 วางให้แห้งก่อนนำไปประกอบร่วมกับเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 ซึ่ง 1 เจล (10 มิลลิลิตร) มีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้ 40% (w/v) Acrylamide/Bis solution 1.5 มิลลิลิตร, 10X TBE Buffer 1 มิลลิลิตร, Glycerol 1 มิลลิลิตร, DW 6.5 มิลลิลิตร และ 25% APS 20 ไมโครลิตร การผสมสารต่างๆ จากนั้นจึงเติม TEMED 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปเทในชุดเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่เตรียมไว้ ระวังไม่ให้มีฟองอากาศ สอดแผ่นหวี (Comb) ซึ่งทำให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ป้อนยให้เจลแข็งตัวประมาณ 45 นาที จึงนำไปใช้งานหรือเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้จึงนำแผ่นหวีออกและประกอบกับเครื่องสำหรับแยกสารพันธุกรรมในแนวตั้ง เตรียมตัวอย่างโดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ มาผสมกับ Loading dye 2 ไมโครลิตรก่อนนำไปหยอดในช่องสำหรับหยอดตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้วเริ่ม run ใน 1X TBE buffer อาจจะเป็นแบบ Constant voltage หรือ Constant current ก็ได้ เมื่อเสร็จสิ้นการ run เจล นำเอาเจลออกจากชุดเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์จากนั้นเริ่มทำให้แห้งหรือ fix ทันทีเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของขนาดตัวอย่าง (Band) จึงทำการย้อมเพื่อตรวจสอบขนาดตัวอย่างโดยนำแผ่นเจลไปย้อมใน Ethidium bromide ประมาณ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนำมาส่องด้วยแสง UV และถ่ายรูปบนเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel image systems with UV transilluminator)

### การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

เมื่อทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอเรซิสแยกขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และถ่ายรูบบนเครื่องถ่ายเจลแล้ว นำเจลไปตัดเอาเฉพาะชั้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการใส่หลอดปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Elution buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อสกัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ออกจากเจล บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ตูดเอาสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ที่ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม Elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดเดิมเพื่อสกัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ส่วนที่ยังตกค้างอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตูดเอาสารละลายส่วนบนใส่หลอดปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายที่ตูดมาแล้ว 300 ไมโครลิตร ตกตะกอนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยการเติม Sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมเอธานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที จึงนำมาปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ระวังไม่ให้ตะกอนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่กั้นหลอดหลุดออกมา ล้างด้วยเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และตูดสารละลายทิ้ง ทำให้แห้งโดยยกให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ละลายด้วย DW ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 5-7 ไมโครลิตร นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 เพื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้วประมาณค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ เก็บผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำปฏิกิริยาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

#### การทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่วนประกอบของการทำเพื่อตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาผสมปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร (BDT ready reaction mix, BigDye Sequencing buffer, Primer, DNA template และ DW) โดยไพรเมอร์ที่ใช้จะเลือกให้เหมาะสมกับความสามารถในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มากที่สุด จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ติดฉลากแล้วมาทำให้บริสุทธิ์

เติม DW 7.25 ไมโครลิตร เอทานอลบริสุทธิ์ 31.25 ไมโครลิตร และ Sodium acetate ที่ pH 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ 1.25 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ควรเก็บพื้นแสง ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำให้แห้งโดยการให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หากยังไม่ทำขั้นตอนต่อไป) มาเติม Hidi formamide 12 ไมโครลิตร ให้ความร้อนอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 2 นาที นำตัวอย่างใส่ในหลุมของ 96 well plate ก่อนนำเข้ากับเครื่อง ABI 3130 Genetic Analyzer จึงอ่านผลโดยการอ่านอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรม

#### **การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI PRISM 3130 DNA sequencer**

การหาลำดับเบส (DNA sequencing) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI PRISM 3130 DNA Sequencer สามารถระบุการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสบนสายดีเอ็นเอจากการแทนที่ การขาดหายไปหรือการเพิ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็กได้ และสามารถจำแนกการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสได้อย่างมีประสิทธิภาพ การวิเคราะห์ลำดับเบสโดยมีนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 4 ชนิดรวมด้วยในปฏิกิริยาทั้ง Deoxynucleotide (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) และ Dideoxynucleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP และ ddTTP) โดยติดสารเรืองแสงที่ต่างกันไว้ที่ Dideoxynucleotide ทั้ง 4 ชนิด ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะดำเนินไปแล้วหยุดเมื่อมีการต่อสายด้วยนิวคลีโอไทด์ชนิดที่เป็น Dideoxynucleotide ทำให้เกิดการหยุดสร้างสายดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่มีเบสต่าง ๆ กันมีผลให้สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่มีขนาดต่างกัน จากนั้นจึงนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่องอ่านแบบอัตโนมัติโดยใช้แสงเลเซอร์และเครื่องตรวจจับสัญญาณ ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่มีความยาวเพิ่มขึ้นทีละหนึ่งนิวคลีโอไทด์และมีสารเรืองแสงตามชนิดของ Dideoxynucleotide เมื่อเคลื่อนที่ผ่านแสงเลเซอร์จะถูกอ่านเป็นลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ

## การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับแหล่งข้อมูลธนาคารยีน (GenBank)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COMT* ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึม สเปคตรัมว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกับฐานข้อมูลจีโนมของมนุษย์ที่ศึกษาอย่างไร ใน GenBank โดยใช้โปรแกรมบลาสท์ (BLAST)

BLAST หรือ Basic Local Alignment Search Tool คือโปรแกรมที่ทำหน้าที่ในการค้นหาความเหมือน (Identity) หรือความคล้ายคลึง (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการค้นหากับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (Database) โดยมีอัลกอริทึม (Algorithms) ในการคำนวณที่แตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน ซึ่งการออกแบบโปรแกรมบลาสท์มีให้เลือกใช้ตามวัตถุประสงค์ของงานที่ต้องการศึกษา โดยบลาสท์ที่นิยมเลือกใช้งานได้แก่ blastn, blastp, blastx, tblastn, tblastx ซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยการศึกษาเลือกคำสั่ง blastn ซึ่งใช้สำหรับค้นหาข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล โดยใช้ข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการเปรียบเทียบลงไป

## หลักการเขียนสัญลักษณ์การกลายพันธุ์

การเขียนสัญลักษณ์การกลายพันธุ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมจะช่วยให้สามารถระบุตำแหน่งการเปลี่ยนที่เกิดขึ้นได้ทั้งในระดับดีเอ็นเอและโปรตีน เข้าใจง่ายและสามารถสืบค้นตำแหน่งดังกล่าวที่สนใจได้รวดเร็วขึ้น (Antonarakis et al., 1998; den Dunnen and Antonarakis, 2000; 2001; Ogino et al., 2007)

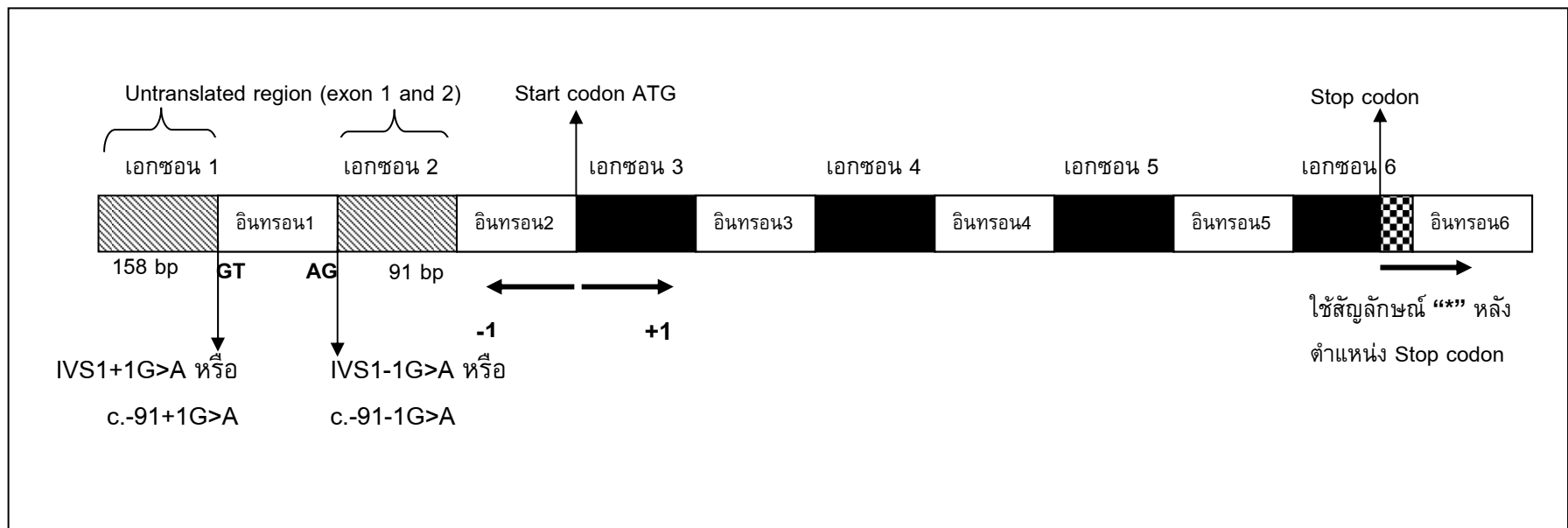
## การเขียนความผิดปกติระดับดีเอ็นเอ

1. กำหนดการใช้ Accession number ที่อ้างจาก Primary sequence databases (Genbank, EMBL, DDJB, SWISSPROT) ซึ่งจะใช้ Accession number เดียวกันทั้งหมด
2. กำหนดให้เบสอะดีนีน (A) ของ ATG ที่เป็นลำดับเบสของเมทไทโอนีนตัวแรกทั้ง Genomic DNA และ cDNA reference sequence ให้เรียกตำแหน่งไปทาง 5' เป็น -1 และ 3' เป็น +1

3. สำหรับ Genomic DNA ให้ใช้ “g.” นำหน้าตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide number) ซึ่งสามารถเขียนได้เป็น “g.(Nucleotide number)” เช่น g.3081435G>A (รูปที่ 39)
4. สำหรับ cDNA reference sequence ให้ใช้ “c.” นำหน้าตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสามารถเขียนได้เป็น “c.(Nucleotide number)” เช่น c.-227G>A (รูปที่ 39)
5. สัญลักษณ์ “\_” (Underscore) กั้นลำดับนิวคลีโอไทด์แรกกับนิวคลีโอไทด์สุดท้ายที่เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น 3\_4insC (รูปที่ 48)
6. สัญลักษณ์ “\*” (Star) แสดงตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน โดยนับลำดับนิวคลีโอไทด์หลังรหัสหยุดการสังเคราะห์ (Stop codon) เช่น \*3\_\*4insC (รูปที่ 48)
7. การแทนที่ (Substitutions) ใช้สัญลักษณ์ “>” อธิบายการแทนที่ลำดับเบสจาก reference sequence เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ เช่น 27G>T หมายถึง ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 27 เปลี่ยนจาก Reference sequence G ไปเป็น T
8. การขาดหายไป (Deletions) ใช้สัญลักษณ์ “del” เขียนหลังลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หายไป เช่น 4del หรือเขียนได้อีกแบบคือ 4delC หมายถึง เบสไซโทซีน (C) ที่ตำแหน่ง 4 ขาดหายไป (รูปที่ 48)
9. การแทรกเพิ่ม (Insertions) ใช้สัญลักษณ์ “ins” ตามด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แทรกเพิ่มมา เช่น 3\_4insC หมายถึง มีลำดับเบสไซโทซีน (C) แทรกเพิ่มมาระหว่างตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 และ 4 (รูปที่ 48)
10. การเกิดความผิดปกติบริเวณอินทรอน สามารถเขียนโดยใช้ตำแหน่งของอินทรอน (Intron number) โดยใช้สัญลักษณ์ “IVS” หรือใช้การเขียนแบบตำแหน่ง cDNA โดยที่ เลขบวกนับเริ่มจากตำแหน่ง G ของ GT splice donor site ส่วนเลขลบนับเริ่มจาก G ของ AG splice acceptor site เช่น IVS1+1G>A หมายถึง ลำดับเบสกวานีน (G) เปลี่ยนเป็นลำดับเบสอะดีนีน (A) ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ +1 ของอินทรอน 1 (รูปที่ 7 และ 39)
11. การแทรกเพิ่มหรือการขาดหายไป (Insertion-Deletion) ใช้สัญลักษณ์ “Indel” ในกรณีที่ไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่ามีการขาดหายไปหรือแทรกเพิ่มขึ้นมา เช่น \*3\_\*12IndelC หมายถึง มีการแทรกเพิ่มหรือขาดหายไปของลำดับเบสไซโทซีน (C) ระหว่างตำแหน่ง 3 ถึง 12 หลังจากหยุดการสังเคราะห์โปรตีน (ตารางที่ 15)

### การเขียนความผิดปกติระดับโปรตีน

1. กำหนดให้โคดอนของเมทไทโอนีนตำแหน่งแรกที่เริ่มสังเคราะห์โปรตีนเป็นโคดอน 1
2. สัญลักษณ์ “p.” (Protien) แสดงการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีน ตามด้วยกรดอะมิโน ตำแหน่งโคดอนและกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น p.V92M หมายถึง กรดอะมิโนวาเลีน (Valine; V) ที่ตำแหน่งโคดอน 92 เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนเมทไทโอนีน (Methionine; M) (รูปที่ 42)
3. โคดอนหยุดเขียนโดยใช้ “X” เช่น p.R97X หมายถึง กรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine; R) ที่ตำแหน่งโคดอน 96 เปลี่ยนเป็นโคดอนหยุด
4. สัญลักษณ์กรดอะมิโนที่ใช้ควรเป็นพยัญชนะตัวเดียวหรืออาจใช้ 3 ตัวก็ได้ เช่น p.V92M อาจเขียนเป็น Val92Met
5. การขาดหายไป (Deletions) ใช้สัญลักษณ์ “del” เขียนหลังกรดอะมิโนที่หายไป เช่น I37-H41del (หรือ I37-H41del5) หมายถึง กรดอะมิโนไอโซลิวซีน (Isoleucine; I) ที่ตำแหน่งโคดอน 37 ถึงกรดอะมิโนฮิสติดีน (Histidine; H) ขาดหายไป
6. การแทรกเพิ่ม (Insertions) ใช้สัญลักษณ์ “ins” ตามหลังกรดอะมิโนที่แทรกเพิ่มมา เช่น T97-W98insLQS (หรือ T97-W98ins3) หมายถึง มีกรดอะมิโนเพิ่มมา 3 ตำแหน่งคือ ลิวซีน (Leucine; L) กลูตามีน (Glutamine; Q) และเซอรีน (Serine; S) ระหว่างกรดอะมิโนทรีโอนีน (Threonine, T) ตำแหน่งโคดอนที่ 97 และกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan, W) ตำแหน่งโคดอนที่ 98
7. การเลื่อนกรอบ (Frame-Shifting) ใช้สัญลักษณ์ “fs.” เช่น T97fs หมายถึง มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนทรีโอนีน (Threonine, T) ตั้งแต่ตำแหน่ง 97 เป็นต้นไป



รูปที่ 7 แสดงการเขียนสัญลักษณ์ความผิดปกติระดับดีเอ็นเอของยีน *COMT* ในรูปแบบ MB-COMT



## การวิเคราะห์และทำนายตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป

การวิเคราะห์และทำนายหน้าที่ของกรดอะมิโนที่อาจส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติ และ/หรือ หน้าที่ของโปรตีน การทำนายผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนสามารถวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศที่ให้บริการทางอินเทอร์เน็ต ซึ่งมีใช้กันเป็นจำนวนมาก โดยมีหลักการที่ใช้ทำนายพื้นฐานคล้ายๆ กัน โดยยึดตามลำดับเบสอนุกรม (Sequence conservation) และโครงสร้างโปรตีน (Protein structure) โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้โปรแกรม Sorting Intolerant (SIFT) เป็นเครื่องมือที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Ng PC และ Henikoff S. อาศัยหลักการของ Sequence homology ในการเปรียบเทียบโดยการทำ Alignment ระหว่างยีนที่มีความสัมพันธ์หรือเกี่ยวเนื่องกันระหว่างโดเมนของแต่ละสปีชีส์ ในการทำนายความเป็นไปได้ของกรดอะมิโนทั้งหมด 20 ตัวที่ถูกแทนที่ด้วยตำแหน่งเหล่านั้นโดย Prediction score ด้วยเครื่องมือนี้ผู้ใช้สามารถทำนายสปีชีส์ที่พบใหม่หรือกรดอะมิโนที่สงสัยได้ รวมถึงโอกาสเกิดการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนทุกรูปแบบ (วสันต์ และคณะ, 2551)

การใช้โปรแกรม SIFT นั้นสามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้ทั้งจากหน้าเว็บไซต์ของ SIFT ที่ให้บริการผ่านอินเทอร์เน็ตและสามารถดาวน์โหลดโปรแกรมมาติดตั้งในฐานข้อมูลส่วนตัวได้ โดยวิธีการใช้งานที่จะอธิบายต่อไปนี้จะเป็นการทำงานผ่านระบบอินเทอร์เน็ตเนื่องจากข้อมูลที่ใช้ศึกษามีจำนวนไม่มาก

1. เข้าสู่หน้าแรก <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html> (รูปที่ 8)

**Sorting Intolerant From Tolerant**  
at the [Fred Hutchinson Cancer Research Center](#).  
Brought to you by the [Blocks WWW server](#).

SIFT predicts whether an amino acid substitution affects protein function based on sequence homology and the physical properties of amino acids. SIFT can be applied to naturally occurring nonsynonymous polymorphisms and laboratory-induced missense mutations.

Given a protein sequence, SIFT will return predictions for what amino acid substitutions will affect protein function.

SIFT is a multistep procedure that:  
(1) searches for and chooses similar sequences  
(2) makes an alignment of these sequences  
(3) calculates scores based on the amino acids appearing at each position in the alignment.

**\*\* กดเลือก\*\***

You can:  
- submit a [dbSNP\\_id](#) (SNPs from multiple proteins, 2 minutes)  
-or- submit a [GI #](#) (2 minutes)  
-or- submit a [protein sequence](#) (10-15 minutes)  
-or- submit a [query sequence along with related sequences](#) (< 1 minute)  
-or- submit [alignment of your query sequence with related sequences](#) (< 1 minute)  
-or submit a [block](#)

**เลือกชนิดของข้อมูลที่ใช้ input**

SIFT for in-house use (version 3.0, released March 21, 2008):  
[Copyright code & exe \(Sun, Linux\)](#) [Report bugs](#)

[Prediction on human SNPs \(Genome Research 12: 436-446 pdf\)](#)  
Initial training/test sets for SIFT: [LaCl](#), [Lysozyme](#), [HIV protease](#)

รูปที่ 8 แสดงหน้าแรกของโปรแกรม SIFT

2. เลือกชนิดของข้อมูลที่ให้นำเข้า โดยที่ Web server ของ SIFT สามารถเลือกได้หลายวิธี (รูปที่ 8) โดยการศึกษาครั้งนี้จะเลือกวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีนที่สนใจ ด้วยวิธีการใช้ลำดับของกรดอะมิโน ดังนั้นกดเลือก “a protein sequence”

3. จากนั้นจะแสดงหน้าต่างสำหรับกรอกข้อมูล จะแบ่งออกเป็น 4 ส่วนใหญ่ๆ คือ “Enter your email address”, “Protein sequence” (รูปที่ 9) , “Substitution to be predicted on” และ “Parameters” (รูปที่ 10) โดยการวิเคราะห์ครั้งนี้จะยกตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากไอโซลิวซีน (I) เป็นกรดอะมิโนวาเลีน (V) ที่ตำแหน่งโคดอน 36 และตำแหน่ง 90 จากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเมทไทโอนีน (M) เป็นกรดอะมิโนวาเลีน (V) ของโปรตีน MB-COMT ที่รายงานพบการเปลี่ยนแปลงซึ่งควรกรอกข้อมูล email address กรอกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบ Fasta (รูปที่ 9)

**SIFT version 2:** Sequences are chosen by a conservation cutoff [\[more details\]](#). This differs from the [original version](#) of SIFT by how the sequences are chosen. The procedure is described in *Genome Research* **12**: 436-446.

This will take 10-15 min. because we must search your protein sequence against a database to pick the related sequences. Before submitting to this website, try [SIFT BLink](#), where you can get SIFT scores almost immediately. You can also [submit your protein sequence and related sequences](#) or [aligned sequences](#) if you already have them.

*Results are deleted after an hour, so please save them!*

**If you are submitting more than 1000 sequences, please [download SIFT](#) and run it locally.**

[\[SIFT home page\]](#) [\[SIFT help\]](#) [\[Preventing connection failures.\]](#)

---

Enter your email address if you want the results through email :

OPTIONAL ← **กรอก email address**

Your mail server will probably consider SIFT to be spam because SIFT sends out a lot of results to many places. Please check your junk or bulk folder for results.

---

Protein sequence

Name of file containing protein query sequence ([fasta format](#)).

MB-COMT

-or-

Paste in your protein query sequence ([fasta format](#)).

```
>gi|47678375|emb|CAG30308.1| COMT [Homo sapiens]
MPEAFPLLLAAVLLGLVLLVLLLLLRHWGWGLCLIGWNEFILQPIHLLMGDTKEQ
RLLNHVQLQHAEPG
NAQSVLEAIDTYCEQKEWAMNVDGKKKIVDAVIQEHQPSVLLLEGAYCGYSAVR
MARLLSPGARLTIE
INPDCAAITQRMVDFAGMKDKVTLVVGASQDIIPQLKKKYDVTLDMVFLDHWKD
RYLPDTLLLEECGLL
RKGTVLLADNVICPGAPDFLAHVIRGSSCFECTHYQSFLYREVVDGLEKAIYKGGP
SEAGF
```

← **ตั้งชื่อและกรอกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนรูปแบบ FASTA**

รูปที่ 9 แสดงหน้าต่างสำหรับกรอกข้อมูล email address และ Protein sequence ก่อนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SIFT

4. กรอกลำดับกรดอะมิโนที่มีการแทนที่หรือตำแหน่งที่สนใจ (รูปที่10) ในที่นี้กรดอะมิโนที่เปลี่ยนจะเป็น I36V โดยตัวแรกแทนตัวอักษรกรดอะมิโนที่พบในโปรตีน (Wild type) ตัวเลขแทนตำแหน่งที่มีการแทนที่และตัวสุดท้ายแทนกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลง โดยตำแหน่ง M90V นี้สามารถละไว้ได้เนื่องจากโปรแกรม SIFT จะทำการคำนวณความเป็นไปได้ทั้งหมดของกรดอะมิโนทั้ง 20 ตัว หากมีการเปลี่ยนแปลงแต่ละตำแหน่ง และกำหนดค่า Parameter ซึ่งโดยค่าที่ตั้งต้นไว้ส่วนใหญ่จะเป็นค่าที่ผู้พัฒนาโปรแกรมได้ทดสอบแล้วว่าเหมาะสมกับข้อมูลส่วนใหญ่ ในที่นี้จะตั้งค่าฐานข้อมูลที่ต้องการค้นเป็น “SWISS-PROT 51.2 and TREMBL 34.3” ค่า “Median conservation of sequence” จะมีค่าตั้งต้นมาตรฐานที่ 3.0 (โปรแกรม SIFT แนะนำให้ใช้ระหว่าง 2.75-3.25) และการตั้งค่าการคัดกรองความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนข้อมูลตั้งต้น “Remove sequence more than \_\_\_ percent identical to query” ในที่นี้ค่าตั้งต้นที่ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีประโยชน์ในการคัดกรองลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนที่ทดสอบ เมื่อกรอกข้อมูลเรียบร้อยแล้ว จึงกดเลือก “Submit Query” เพื่อให้โปรแกรมดำเนินการวิเคราะห์ (รูปที่ 10)

Substitutions to be predicted on (can be left blank)

Enter the name of file containing substitutions of interest [format]:

-or-

Enter the substitutions of interest [format]:

**กรอกข้อมูลของกรดอะมิโนที่มีการแทนที่ในรูปแบบ I36V**

Parameters

Select database to search:

**เลือกฐานข้อมูลที่จะใช้วิเคราะห์**

Median conservation of sequences  (between 0 and 4.32, we recommend between 2.75 and 3.25)

Remove sequences more than  percent identical to query  
This cleans out any polymorphic alleles (sequences in the database that are nearly identical to your protein but already contain contaminating sequences may cause the substitution to be predicted as tolerated).

**\*\* กดเลือก \*\***

Questions or comments?  
[Contact us](#)

รูปที่ 10 แสดงหน้าต่างสำหรับกรอกข้อมูล “Substitution to be predicted on” และ “Parameters” ก่อนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SIFT

## 5. หน้าต่างจะแสดงผลการวิเคราะห์ประกอบด้วย 4 ส่วนหลัก

a. จุดเชื่อมโยง (Link) ไปสู่หน้าต่างใหม่ที่แสดงผลการทำ Alignment (รูปที่ 11)

b. จุดเชื่อมโยงไปสู่หน้าต่างใหม่ที่แสดงผลการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในแต่ละตำแหน่งเมื่อมีโอกาสเปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโนทั้ง 20 ตัว (รูปที่ 11 และ 12) โดยการแสดงผลจะแบ่งเป็นกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีการแทนที่ กลุ่มแรก (คอลัมน์ซ้าย: Predict Not Tolerated) เป็นกลุ่มที่อาจส่งผลการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน และกลุ่มที่สอง (คอลัมน์ขวา: Predict Tolerated) เป็นกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่อาจไม่ส่งผลกระทบต่อโปรตีน

c. จุดเชื่อมโยงไปสู่หน้าต่างใหม่ที่แสดงค่าความเป็นไปได้ (Scaled Probabilities) ที่คำนวณโดย SIFT ในทุกตำแหน่งกรดอะมิโนของโปรตีนที่สนใจ โดยการแสดงผลในรูปแบบของตาราง Matrix (รูปที่ 11 และ 13)

d. จุดเชื่อมโยงไปสู่หน้าต่างใหม่ที่แสดงผลการวิเคราะห์เฉพาะกรดอะมิโนที่สนใจ (รูปที่ 11 และ 14) โดยจะเป็นเฉพาะตำแหน่งที่กรอกข้อมูลในช่อง “Enter the substitutions of interest” ของขั้นตอนการกรอกข้อมูลเริ่มต้น (ในที่นี้แสดงผลการวิเคราะห์ของตำแหน่งที่ 63 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก I ไปเป็น V)

**SIFT results**

Your job id is 25163 and is currently running. If your browser times out before results are shown, open this [link](#) in 20 minutes in a new window.

Problems? Contact [us](#) with your job id.

Your results will be available [here](#) for the next 24 hours.

**29** sequences were selected to be closely related to your query sequence. ← **a. แสดงผล alignment**

[PSIBLAST alignment of submitted sequences](#)  
[Alignment in FASTA format](#) (for modification)  
 The alignment taken from PSIBLAST is returned in msf format.  
**Note:** Xes are placeholders at the beginning and end of sequences. While - means a gap in the alignment an X means a lack of information such as an incomplete sequence and do not contribute to the prediction.  
 Please check the sequences that have been chosen. If the sequences are too diverged from your query or the alignment is questionable, we suggest you download the formatted file above and [resubmit](#).

SIFT amino acid predictions for: ← **b. แสดงผลการวิเคราะห์ความเป็นไปได้การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในแต่ละตำแหน่งที่อาจส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของโปรตีน**

[Positions 1 to 100](#)  
[Positions 101 to 200](#)  
[Positions 201 to 300](#)

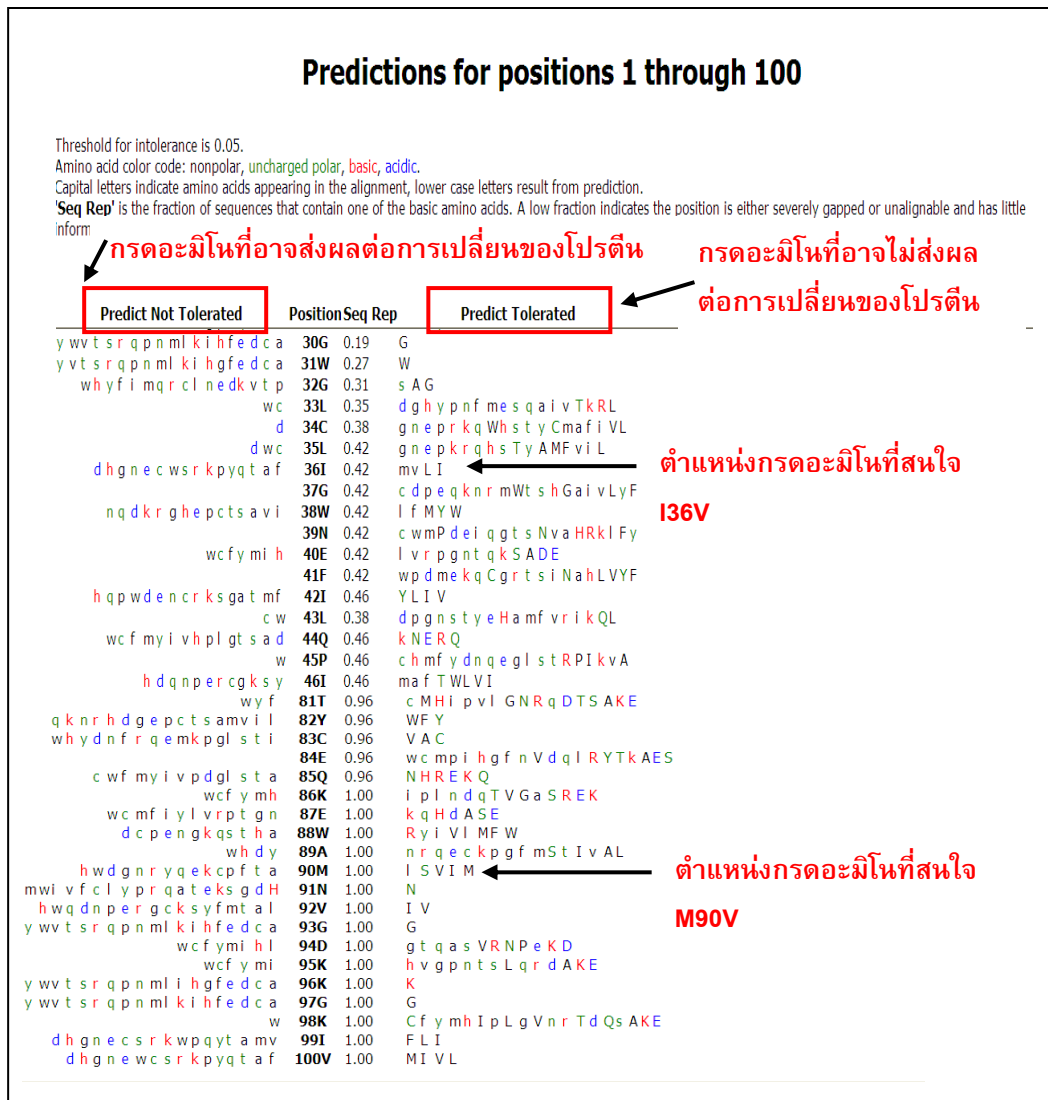
[Scaled Probabilities for Entire Protein](#) ← **c. แสดงค่าความเป็นไปได้ของกรดอะมิโนแต่ละตำแหน่งแสดงผลในรูปแบบเมทริกซ์**

**May take some time to load!! Please be patient if you do not see the table immediately.**  
 Amino acids with probabilities < .05 are predicted to be deleterious.

[Predictions of substitutions entered](#) ← **d. แสดงผลการวิเคราะห์เฉพาะกรดอะมิโนที่สนใจ**

\*\*\* The following sequences have been removed because they were found to be over 90% identical with your protein query: P21964, Q61B07, Q61CE6, Q9BWC7, ...

รูปที่ 11 แสดงหน้าต่างหลักที่แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SIFT



รูปที่ 12 แสดงผลการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่อาจส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของโปรตีนในแต่ละตำแหน่งเมื่อมีโอกาสเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนทั้ง 20 ตัว โดยที่ตำแหน่ง 36 จากการศึกษาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไอโซลิวซีนเป็นวาเลอีนและตำแหน่ง 90 จากการเปลี่ยนกรดอะมิโนเมทไทโอนีนเป็นวาเลอีน พบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีน

## Probabilities

Each row corresponds to a position in the reference protein. Below each position is the fraction of sequences that contain one of the basic amino acids. A low fraction indicates the position is either severely gapped or unalignable and has little information. Expect poor prediction at these positions.

Each column corresponds to one of the twenty amino acids.

Each entry contains the score at a particular position (row) for an amino acid substitution (column). Substitutions predicted to be intolerant are highlighted in red.

pos	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
26L	0.04	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
27R	0.19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
28H	0.19	0.040	0.010	0.030	0.050	0.020	0.041	0.000	0.020	0.150	0.040	0.010	0.050	0.030	0.060	0.260	0.040	0.040	0.020	0.010
29W	0.19	0.060	0.020	0.010	0.020	0.300	0.020	0.020	0.210	0.031	0.000	0.130	0.020	0.030	0.030	0.030	0.030	0.040	0.140	0.840
30G	0.19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
31W	0.27	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
32G	0.31	0.410	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.030	0.010	0.010	0.060	0.020	0.020	0.000	0.000
33L	0.35	0.200	0.030	0.050	0.140	0.120	0.090	0.090	0.230	0.451	0.000	0.130	0.110	0.090	0.190	0.530	0.150	0.260	0.240	0.030
34C	0.38	0.210	0.190	0.040	0.060	0.240	0.060	0.080	0.500	0.071	0.000	0.200	0.060	0.070	0.070	0.070	0.080	0.150	0.610	0.080
35L	0.42	0.190	0.050	0.040	0.060	0.240	0.050	0.070	0.390	0.071	0.000	0.230	0.050	0.060	0.070	0.070	0.080	0.120	0.340	0.130
36I	0.42	0.020	0.010	0.000	0.010	0.050	0.000	0.000	1.000	0.010	0.920	0.060	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.120	0.010
37G	0.42	0.370	0.120	0.130	0.171	0.000	0.360	0.310	0.400	0.180	0.860	0.230	0.190	0.140	0.180	0.210	0.270	0.260	0.400	0.231
38W	0.42	0.010	0.010	0.000	0.000	0.190	0.000	0.000	0.020	0.000	0.050	0.260	0.000	0.010	0.000	0.000	0.010	0.010	0.021	0.000
39N	0.42	0.590	0.180	0.350	0.400	0.710	0.440	0.600	0.410	0.630	0.690	0.230	0.520	0.270	0.420	0.630	0.520	0.470	0.530	0.191
40E	0.42	0.290	0.010	0.391	0.000	0.010	0.090	0.040	0.030	0.180	0.050	0.020	0.100	0.080	0.170	0.080	0.270	0.100	0.050	0.010
41F	0.42	0.280	0.170	0.110	0.151	0.000	0.180	0.300	0.230	0.160	0.420	0.120	0.250	0.110	0.160	0.190	0.220	0.220	0.500	0.100
42I	0.46	0.010	0.000	0.000	0.000	0.020	0.010	0.000	0.740	0.010	0.310	0.020	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.021	0.000	0.010
80D	0.96	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
81T	0.96	0.740	0.050	0.611	0.000	0.050	0.380	0.140	0.180	0.940	0.290	0.130	0.480	0.260	0.560	0.510	0.710	0.670	0.270	0.020
82Y	0.96	0.000	0.000	0.000	0.000	0.580	0.000	0.000	0.010	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.130
83C	0.96	0.351	0.000	0.000	0.010	0.000	0.010	0.000	0.020	0.010	0.020	0.010	0.000	0.010	0.000	0.000	0.020	0.020	0.170	0.000
84E	0.96	0.920	0.160	0.591	0.000	0.510	0.500	0.450	0.400	0.880	0.660	0.230	0.570	0.350	0.630	0.681	0.000	0.770	0.570	0.140
85Q	0.96	0.040	0.000	0.030	0.320	0.010	0.030	0.200	0.010	0.380	0.030	0.010	0.180	0.021	0.000	0.310	0.040	0.040	0.020	0.000
86K	1.00	0.210	0.020	0.160	0.330	0.020	0.200	0.040	0.051	0.000	0.090	0.030	0.140	0.080	0.180	0.270	0.230	0.190	0.200	0.010
87E	1.00	0.170	0.000	0.121	0.000	0.010	0.040	0.110	0.010	0.060	0.020	0.010	0.040	0.030	0.060	0.020	0.180	0.030	0.020	0.000
88W	1.00	0.050	0.010	0.010	0.020	0.330	0.020	0.040	0.090	0.030	0.230	0.320	0.020	0.020	0.030	0.070	0.030	0.030	0.151	0.000
89A	1.00	0.780	0.090	0.040	0.080	0.170	0.160	0.030	0.530	0.091	0.000	0.210	0.060	0.140	0.080	0.060	0.240	0.270	0.690	0.030
90M	1.00	0.040	0.010	0.000	0.010	0.020	0.000	0.000	0.300	0.010	0.111	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.110	0.030	0.290	0.000
91N	1.00	0.000	0.000	0.020	0.010	0.000	0.010	0.030	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
92V	1.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.290	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
93G	1.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
94D	1.00	0.080	0.010	0.000	0.130	0.010	0.060	0.020	0.020	0.220	0.030	0.010	0.120	0.120	0.070	0.100	0.080	0.060	0.090	0.000
95K	1.00	0.290	0.010	0.291	0.000	0.020	0.100	0.060	0.050	0.740	0.170	0.030	0.110	0.100	0.230	0.240	0.140	0.130	0.080	0.010
96K	1.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
97G	1.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
98K	1.00	0.810	0.080	0.621	0.000	0.090	0.390	0.150	0.250	0.980	0.380	0.120	0.500	0.280	0.640	0.530	0.740	0.620	0.390	0.030
99I	1.00	0.010	0.000	0.000	0.000	0.080	0.000	0.000	1.000	0.000	0.290	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000
100V	1.00	0.010	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.180	0.000	1.000	0.140	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.260	0.000

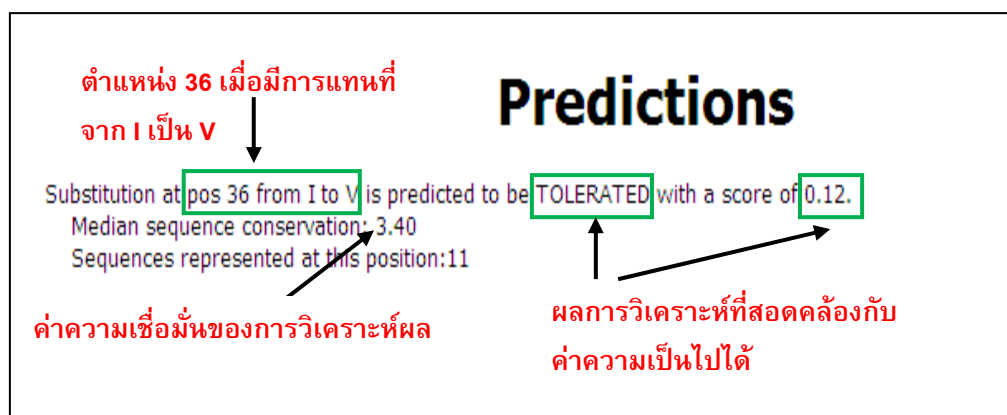
ตำแหน่งที่  
สนใจ I36V

ตำแหน่งที่  
สนใจ M90V

รูปที่ 13 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นไปได้ที่คำนวณโดยโปรแกรม SIFT ในทุกตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สนใจ โดยแสดงผลในตารางเมทริกซ์ การเปลี่ยนที่ตำแหน่ง I36V มีค่าความเป็นไปได้เท่ากับ 0.12 (มากกว่า 0.05) และตำแหน่ง M90V มีค่าความเป็นไปได้เท่ากับ 0.29 (มากกว่า 0.05) ซึ่งทำนายว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่น่าจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีน

6. การอ่านผล SIFT สามารถดูผลการวิเคราะห์ได้ทั้งที่เป็นข้อความ (รูปที่ 14) เช่น หากตำแหน่งที่มีการแทนที่กรดอะมิโนถูกทำนายว่าอาจส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของโปรตีน โปรแกรมจะแสดงผลทำนายเป็น "Affect Prtein Function" เป็นตัวหนังสือสีแดง ซึ่งการทำนายนี้จะสอดคล้องกับค่าความเป็นไปได้ซึ่งจะต้องต่ำกว่า "0.05" ในทางตรงกันข้าม หากตำแหน่งที่มี

การแทนที่กรดอะมิโนนั้นไม่ส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของโปรตีน โปรแกรมจะแสดงผลทำนายเป็น “Tolerated” และสอดคล้องกับค่าความเป็นไปได้ที่มีค่ามากกว่า “0.05”



**รูปที่ 14** แสดงผลการวิเคราะห์เฉพาะกรดอะมิโนที่สนใจ ผลการทำนายพบว่าตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 36 มีการแทนที่จากกรดอะมิโนไอโซลิวซีนไปเป็นวาลีนมีผลการวิเคราะห์เท่ากับ 0.12 (มากกว่า 0.05) ซึ่งไม่น่าส่งผลต่อโปรตีน ที่ค่าความเชื่อมั่นของการวิเคราะห์ผล 3.40

## การศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์บนยีน *COMT*

### การเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม (ตำแหน่งสลิปส์)

ตำแหน่งสลิปส์ที่เลือกศึกษา เลือกจากผลการตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน *COMT* ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม หากพบความหลากหลายทางพันธุกรรมหลังการตรวจกรองลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน หรือเป็นตำแหน่งสลิปส์ที่ส่งผลต่อความผิดปกติของพัฒนาการทางสมองหรือระบบประสาทที่มีลักษณะอาการใกล้เคียงหรือสัมพันธ์กับผู้ป่วยออทิซึมที่พบความสัมพันธ์มีกลุ่มประชากรใกล้เคียงกับคนไทย และมีการกระจายตัวของแอลลีลที่เหมาะสม นำตำแหน่งดังกล่าวมาศึกษาในบิดามารดาของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมเพื่อศึกษาความสัมพันธ์

หลังจากการตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน *COMT* พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมตำแหน่ง rs4680 และ rs4818 บริเวณเอกซอน 4 จึงนำสลิปส์ทั้งสองตำแหน่งมาศึกษาความสัมพันธ์แบบ Family-based study โดยสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 มีการศึกษาด้วยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติเพื่อยืนยันผล ทำให้สามารถศึกษาสลิปส์ตำแหน่ง rs4818 ด้วย ส่วน

การศึกษาความสัมพันธ์แบบ Population-based case control study ศึกษาสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 ด้วยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์

### การศึกษาสลิปส์ด้วยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.25-0.50 ไมโครโมลาร์ และสาร adjuvant DMSO 5% ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมและใช้ 1.0 ยูนิต Taq DNA polymerases (Invitrogen) ในปฏิกิริยา PCR ของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 (ตารางที่ 7 และ 8) และสภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (ตารางที่ 9) และผลพีซีอาร์จากเจลอะครีลาไมด์ (รูปที่ 15)

ตารางที่ 7 แสดงไพรเมอร์ของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 ของยีน *COMT* จากการศึกษาของ Ruiz-Sanz et al., 2007

สลิปส์	ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์ (5'-3')	Product size (bp)
rs4680	P1(CF)	CCAACCCTGCACAGGCAAGAT	626
	P2(CR)	CAAGGGTGACCTGGAACAGCG	
	P3(GF)	CGGATGGTGGATTTGCTGACG	451
	P4(AR)	TCAGGCATGCACACCTTGCCTTTAT	222

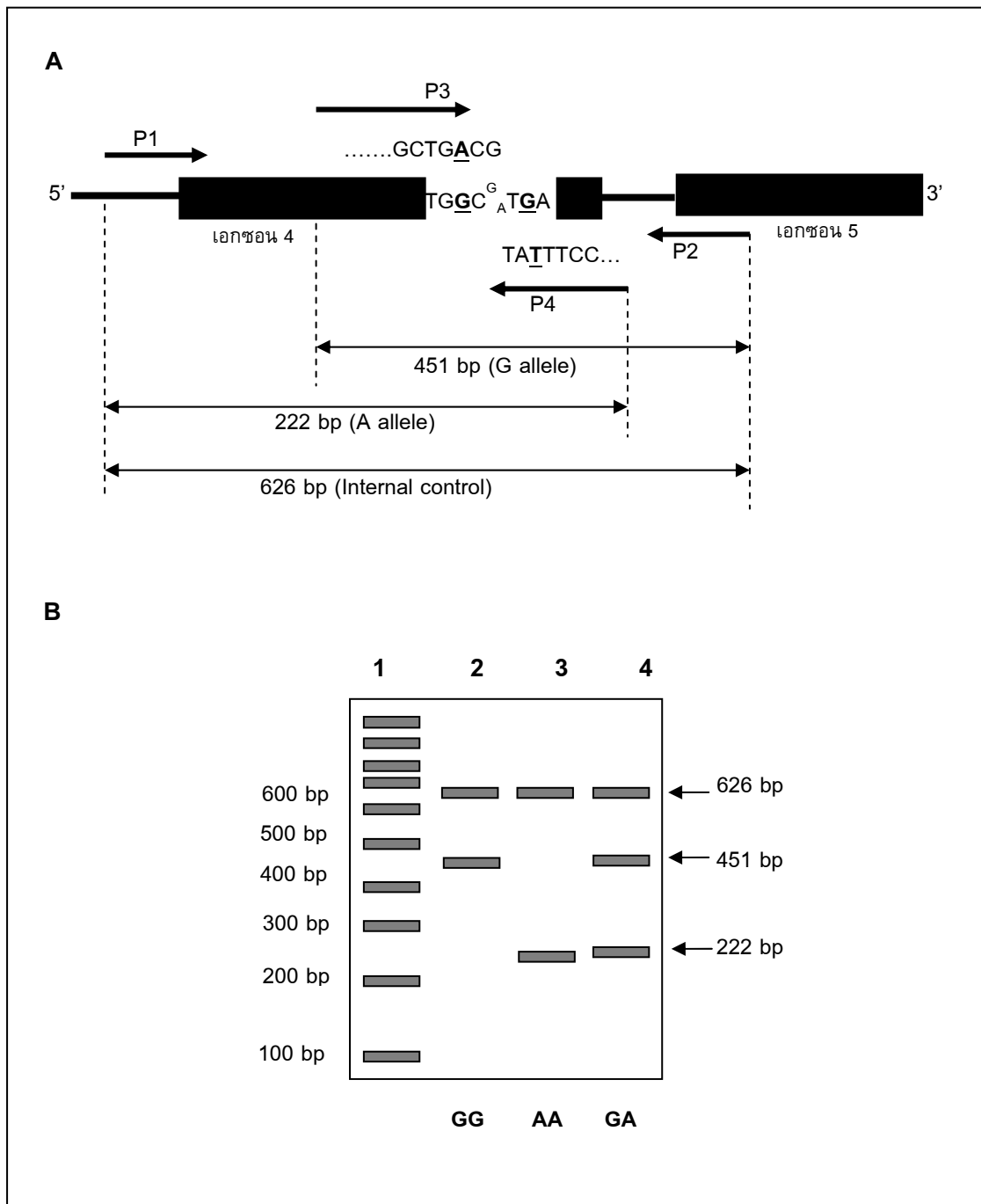
ตารางที่ 8 แสดงส่วนประกอบและสภาวะสำหรับการทำพีซีอาร์ของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 ของยีน *COMT*

สลิปส์	ชื่อไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ( $\mu M$ )	ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ (mM)	Adjuvant	Annealing temperature ( $^{\circ}C$ )	Product size (bp)
rs4680	P1(CF)	0.25	1.25	5% DMSO	62	626
	P2(CR)	0.25				451
	P3(GF)	0.50				222
	P4(AR)	0.50				



ตารางที่ 9 แสดงสภาวะสำหรับทำพีซีอาร์ของสลิปตำแหน่ง rs4680 ของยีน COMT

ตำแหน่งสลิป ขั้นตอน	rs4680 (จาก Ruiz-Sanz et al., 2007)		
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	95	5 นาที	30
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing	66	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	



รูปที่ 15 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 (Ruiz-Sanz et al., 2007) A. แสดงผลพีซีอาร์ B. แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ แถว 1 เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว 2-4 เป็นตัวอย่างที่ศึกษา การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Internal control มีขนาด 626 คู่เบส แถว 2 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส GG แถว 3 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส AA แถว 4 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส GA ตามลำดับ

### การศึกษานิพจน์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ

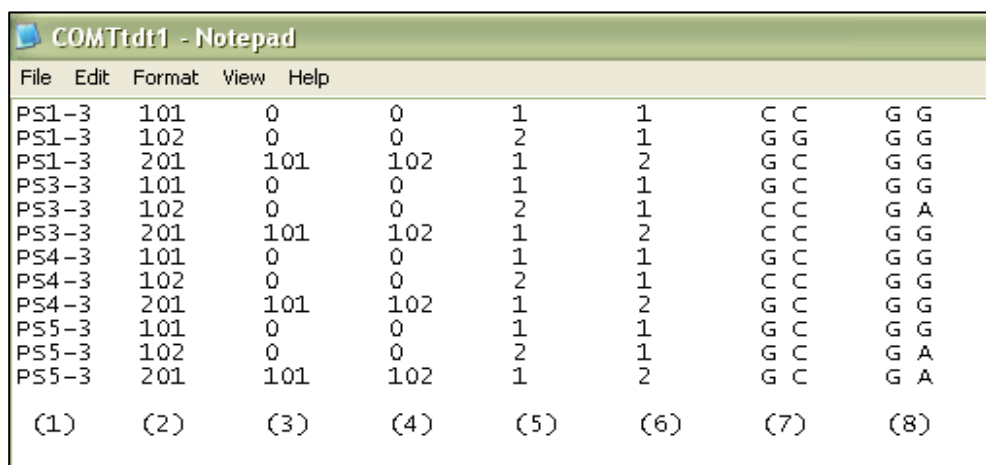
การศึกษานิพจน์ตำแหน่ง rs4680 อีกวิธีหนึ่งเป็นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ เพื่อยืนยันผลจากวิธีไบเอสส์ลิกอาร์มพีซีอาร์อีกครั้ง ทำให้สามารถศึกษานิพจน์ตำแหน่ง rs4818 อีกตำแหน่งโดยวิธีการและขั้นตอนการศึกษาจะสอดคล้องกับขั้นตอนการตรวจกรองการกลายพันธุ์ใน COMT บริเวณเอกซอน 4

### การศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม PLINK V1.05

โปรแกรม PLINK (Package: PLINK) ถูกพัฒนาขึ้นโดย Shaun Purcell (URL: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) เป็นโปรแกรมที่ทำงานผ่าน Command Prompt โดยข้อมูลที่ศึกษาจะต้องประกอบด้วยข้อมูลจีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาและตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ศึกษา การศึกษาจะวิเคราะห์ค่าฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะสมดุลและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Association analysis) จากกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

### การเตรียมข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์

(1) ข้อมูลจีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่าง การจัดเก็บข้อมูลส่วนใหญ่มักอยู่ในรูป Microsoft office แบบ excel จากนั้นจึงแปลงไฟล์ข้อมูลตามชื่อไฟล์ที่ต้องการและบันทึกนามสกุลเป็น .txt (รูปที่ 16) ให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถทำงานผ่าน Command Prompt ได้



(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)		
PS1-3	101	0	0	1	1	C	C	G	G
PS1-3	102	0	0	2	1	G	G	G	G
PS1-3	201	101	102	1	2	G	C	G	G
PS3-3	101	0	0	1	1	G	C	G	G
PS3-3	102	0	0	2	1	C	C	G	A
PS3-3	201	101	102	1	2	C	C	G	G
PS4-3	101	0	0	1	1	C	C	G	G
PS4-3	102	0	0	2	1	C	C	G	G
PS4-3	201	101	102	1	2	G	C	G	G
PS5-3	101	0	0	1	1	G	C	G	G
PS5-3	102	0	0	2	1	G	C	G	A
PS5-3	201	101	102	1	2	G	C	G	A

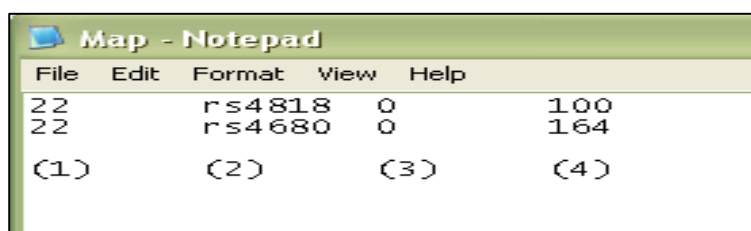
รูปที่ 16 แสดงการเตรียมข้อมูลจีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

## คำอธิบาย

- (1) Family ID เป็นตัวกำหนดรหัสของครอบครัว (Individual family) ที่ศึกษา กรณีที่ศึกษาแบบ Family-based study จะกำหนดรหัสของครอบครัวบิดามารดาและลูกเหมือนกัน (PS AR และ TM) สำหรับการศึกษแบบ Population-based case control study จะมีรหัสต่างกันจะเป็นรหัสของผู้ป่วย (PS AR และ TM) เทียบกับรหัสของกลุ่มควบคุม (CT และ CP)  
 รหัส PS เป็นตัวอย่างจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์  
 รหัส AR เป็นตัวอย่างจากโรงพยาบาลรามาริปดี  
 รหัส TM เป็นตัวอย่างจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์  
 รหัส CT เป็นตัวอย่างกลุ่มควบคุมจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์  
 รหัส CP เป็นตัวอย่างกลุ่มควบคุมจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
- (2) Individual ID การกำหนดรหัสของแต่ละบุคคลในครอบครัวสำหรับการวิเคราะห์แบบ Family-based study บิดาของผู้ป่วยกำหนดรหัสเป็น 101 มารดาของผู้ป่วยกำหนดรหัสเป็น 102 ผู้ป่วยกำหนดรหัสเป็น 201 สำหรับการวิเคราะห์แบบ Population-based case control study ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุมนั้นกำหนดรหัส 201 ส่วนรหัสของบิดาและมารดาซึ่งจะไม่มีทดสอบจะกำหนดรหัสเป็น 0
- (3) Paternal ID การกำหนดรหัสของบิดาของแต่ละครอบครัว เนื่องจากการศึกษาดังกล่าวเป็นการศึกษาแบบ Trios (บิดา-มารดา-ลูก) สำหรับการศึกษแบบ Family-based study กำหนดรหัสของบิดาเป็น 101 ส่วนการวิเคราะห์แบบ Population-based case control study การกำหนดรหัสของบิดาจะเป็น 0
- (4) Maternal ID การกำหนดรหัสของมารดาของแต่ละครอบครัว เนื่องจากการศึกษาดังกล่าวเป็นการศึกษาแบบ Trios (บิดา-มารดา-ลูก) สำหรับการศึกษแบบ Family-based study กำหนดรหัสของมารดาเป็น 102 ส่วนการวิเคราะห์แบบ Population-based case control study การกำหนดรหัสของมารดาจะเป็น 0
- (5) Sex เพศของตัวอย่างที่ศึกษา เพศชายกำหนดรหัสเป็น 1 เพศหญิงกำหนดรหัสเป็น 2 และเมื่อไม่ทราบเพศกำหนดรหัสเป็น 0
- (6) Disease status สถานะของตัวอย่างที่ศึกษา เป็นโรคกำหนดรหัสเป็น 2 และไม่เป็นโรคกำหนดรหัสเป็น 1 และเมื่อไม่ทราบสถานะกำหนดรหัสเป็น 0

- (7)–(8) Genotype จีโนไทป์ของตัวอย่างที่ศึกษาในสไนป์ตำแหน่งนั้นๆ ตามลำดับของเบสที่อ่านได้คือ A T C และ G หรือ 1 2 3 และ 4 สำหรับการศึกษแบบ Family-based study มีตำแหน่งสไนป์ rs4818 และ rs4680 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์แบบ Population-based case control study มีตำแหน่งสไนป์ตำแหน่ง rs4680 เพียงตำแหน่งเดียว

(2) การสร้างแผนที่ (Map) การกำหนดตำแหน่งสไนป์ของยีนควรใช้โปรแกรม Notepad โดยสไนป์ตำแหน่งแรกกำหนดเป็นตำแหน่งอ้างอิง (ตั้งค่าที่ 100) และสไนป์ตำแหน่งอื่นที่ศึกษาเป็นระยะห่างจากตำแหน่งอ้างอิงตั้งชื่อไฟล์แผนที่และบันทึกนามสกุลเป็น .txt (รูปที่ 17)



File	Edit	Format	View	Help
22		rs4818	0	100
22		rs4680	0	164
(1)		(2)	(3)	(4)

รูปที่ 17 แสดงแผนที่ (Map) ที่ระบุถึงตำแหน่งของสไนป์ที่ต้องการศึกษา

#### คำอธิบาย

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| (1) Chromosome number             | ตำแหน่งโครโมโซมของสไนป์   |
| (2) rs# or SNP identifier         | ชื่อของสไนป์  |
| (3) Genetic distance (morgans)    | ช่วงระยะเริ่มกำหนดเป็น 0  |
| (4) Base-pair position (bp units) | ระยะห่างของลำดับคู่เบส สำหรับการศึกษแบบ Family-based study มีตำแหน่งสไนป์ rs4818 และ rs4680 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์แบบ Population-based case control study มีตำแหน่งสไนป์ตำแหน่ง rs4680 เพียงตำแหน่งเดียว |

#### การเข้าสู่แหล่งข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์

- 1.1. ผู้ใช้งานต้องเปิดหน้าต่าง Command Prompt โดยเลือกไปที่ Start > Accessories > Command Prompt จะปรากฏหน้าต่าง Command Prompt ขึ้นมา

1.2. ขั้นตอนต่อไปผู้ใช้งานเปลี่ยนตำแหน่งการทำงานไปที่ drive C: หรือ drive อื่นที่เก็บข้อมูลข้างต้นไว้ โดยใช้คำสั่ง cd\ ตามด้วยไฟล์ที่เก็บข้อมูลไว้ โดยข้อมูลที่จะวิเคราะห์บันทึกใน drive E จึงพิมพ์คำสั่ง E: และเข้าโพล์เตอร์ที่ต้องการ cd COMT\_Autism\_2010AUG8 จึงสามารถเข้าสู่แหล่งข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์ (รูปที่ 18)

```

C:\ Command Prompt
Microsoft Windows XP [Version 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.
C:\Documents and Settings\Presario>cd\
C:\>e:
E:\>cd COMT_Autism_2010AUG8
E:\COMT_Autism_2010AUG8>_

```

รูปที่ 18 แสดงการใช้โปรแกรม Command Prompt เพื่อเข้าสู่ไฟล์ที่จะใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูลลักษณะทางคลินิกของเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมในรูปแบบต่างๆ เช่น การเก็บประวัติครอบครัว การวินิจฉัยโรคตามเกณฑ์ DSM-IV จะใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์แบบแยกประเภทเพิ่มเติมได้ เพื่อให้เข้าถึงสาเหตุหรือความสัมพันธ์ที่อาจจะนำไปสู่การเกิดโรคมมากขึ้น ทำให้มีการแยกประเภทของข้อมูลที่ศึกษาเป็นไฟล์ต่างๆ ได้ดังนี้

รูปแบบ	ชื่อไฟล์	
	Population- based case control study	Family-based study
ผู้ป่วยทั้งหมด	COMTcasecontrol1.txt	COMTtdt1.txt
ผู้ป่วยเพศชาย	COMTcasecontrol2.txt	COMTtdt2.txt
ผู้ป่วยออทิซึมตามเกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV	COMTcasecontrol3.txt	COMTtdt3.txt

**การใช้โปรแกรม PLINK วิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Population-based case control study**

(1) การวิเคราะห์ฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะสมดุล (Hardy-Weinberg equilibrium: HWE) สามารถการวิเคราะห์สภาวะสมดุลของกลุ่มผู้ป่วย กลุ่มประชากรปกติ กลุ่มผู้ป่วยร่วมกับ

กลุ่มประชากรปกติ โดยการพิจารณาจะพิจารณาค่าฮาร์ดี-ไวเบอร์กจากกลุ่มประชากรปกติเพื่อดูว่ากลุ่มประชากรที่ศึกษาเข้าสู่สภาวะสมดุลหรือไม่ ซึ่งค่าที่ได้ต้องมีค่า P-value มากกว่า 0.05 ( $P > 0.05$ ) ผู้ใช้จะต้องมีไฟล์นำเข้า (Input) จีโนไทป์ของกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มประชากรปกติ ไฟล์แผนที่ (Map) และกำหนดชื่อไฟล์ Output การวิเคราะห์ค่าฮาร์ดี-ไวเบอร์กจะวิเคราะห์เพียงครั้งเดียวเนื่องจากกลุ่มประชากรปกติเป็นกลุ่มตัวอย่างเดิม

### ตัวอย่างการศึกษา

ไฟล์นำเข้า (Input file)	ไฟล์แผนที่ (Map file)	ไฟล์นำออก (Output file)
COMTcasecontrol1.txt	Map1.txt	COMT_HWE.txt
คำสั่ง plink --ped COMTcasecontrol1.txt --map Map1.txt --hardy --out COMT_HWE (รูปที่ 19) และแสดงผลการวิเคราะห์ (รูปที่ 20)		

```

COMT_HWE - Notepad
File Edit Format View Help
-----@-----
          PLINK!           |    v1.00           |    05/Dec/2007
-----@-----
(C) 2007 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
For documentation, citation & bug-report instructions:
  http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----@-----

web-based version check ( --noweb to skip )
Connecting to web... Problem reading from SNPServer
Problem connecting to web

writing this text to log file [ COMT_HWE.log ]
Analysis started: Thu Aug 12 09:28:20 2010

Options in effect:
  --ped COMTcasecontrol1.txt
  --map Map1.txt
  --hardy
  --out COMT_HWE

1 (of 1) markers to be included from [ Map1.txt ]
438 individuals read from [ COMTcasecontrol1.txt ]
438 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
188 cases, 250 controls and 0 missing
334 males, 104 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 1 SNPs
438 founders and 0 non-founders found
0 of 438 individuals removed for low genotyping ( MIND > 0.1 )
writing Hardy-weinberg tests (founders-only) to [ COMT_HWE.hwe ]
0 markers to be excluded based on HWE test ( p <= 0.001 )
  0 markers failed HWE test in cases
  0 markers failed HWE test in controls
Total genotyping rate in remaining individuals is 1
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 0.1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0.01 )
After frequency and genotyping pruning, there are 1 SNPs

Analysis finished: Thu Aug 12 09:28:20 2010
|

```

รูปที่ 19 แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะสมดุล

SNP	TEST	GENE	O(HET)	E(HET)	P_HWD
rs4680	ALL	40/198/200	0.4521	0.4333	0.4398
rs4680	AFF	21/78/89	0.4149	0.4346	0.5069
rs4680	UNAFF	19/120/111	0.48	0.4323	0.1058

รูปที่ 20 แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะสมดุล

### คำอธิบาย

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| (1) SNP (SNP identifier)             | ระบุชื่อของตำแหน่งสนิปส์   |
| (2) TEST (Code indicating sample)    | ระบุลักษณะตัวอย่างที่ศึกษา ดังนี้<br>All กลุ่มผู้ป่วยร่วมกับกลุ่มประชากรปกติ<br>AFF กลุ่มผู้ป่วย<br>UNAFF กลุ่มประชากรปกติ               |
| (3) Genotype (Genotype count)        | ระบุจำนวนจีโนไทป์จากตัวอย่างที่ศึกษา เช่น<br>40/198/200 มีจีโนไทป์แบบ AA/GA/GG<br>ตามลำดับ   |
| (4) O(HET) (Observed heterozygosity) | ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต   |
| (5) E(HET) (Expected heterozygosity) | ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคำนวณ  |
| (6) P_HWD (H-W P-value)              | ค่า P value ของฮาร์ดี-ไวเบอร์กที่สภาวะ<br>สมดุลแสดงโอกาสความน่าจะเป็นของข้อมูล<br>จีโนไทป์ที่มีการกระจายตัวแตกต่างกันในกลุ่ม<br>ตัวอย่าง |

(2) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Population-based case control study  
รูปแบบคำสั่งการศึกษามีหลายคำสั่ง โดยแต่ละคำสั่งจะจำเพาะกับสิ่งที่ต้องการศึกษา



รูปแบบคำสั่ง	คำอธิบาย
--assoc	ศึกษาความสัมพันธ์ของแอลลีลที่แตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มประชากรปกติ
--model	ศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มประชากรปกติ
--logistic	ศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์โดยจะทำการคำนวณ minor allele และ major allele เพื่อใช้ในการคำนวณ model ต่างๆ additive model, dominant model และ recessive model
--ci 0.95	ช่วงของความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่า Odd ratio จากค่าต่ำสุดถึงค่าสูงสุด ใ้วิเคราะห์หลังคำสั่ง --assoc และ --logistic

ผู้ใช้จะต้องมีไฟล์นำเข้า (Input) จีโนไทป์ของกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มประชากรปกติ ไฟล์แผนที่ (Map) และกำหนดชื่อไฟล์ Output เช่นเดิม โดยไฟล์ที่ศึกษามีทั้งหมด 3 ไฟล์ดังแสดงไว้ตอนต้น

#### ตัวอย่างการศึกษา

รูปแบบคำสั่ง	ไฟล์นำเข้า (Input file)	ไฟล์แผนที่ (Map file)	ไฟล์นำออก (Output file)
	COMTcasecontrol1.txt	Map1.txt	COMT_casecontrol1.txt
--assoc	คำสั่ง plink --ped COMTcasecontrol1.txt --map Map1.txt --assoc --ci 0.95 --out COMT_casecontrol1 (รูปที่ 21) และแสดงผลการวิเคราะห์ (รูปที่ 22)		

```

COMT_casecontrol1 - Notepad
File Edit Format View Help
@-----@
      PLINK!      |      v1.00      |      05/Dec/2007
      (C) 2007 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
      For documentation, citation & bug-report instructions:
      http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
@-----@

Web-based version check ( --noweb to skip )
Connecting to web... Problem reading from SNPServer
Problem connecting to web

writing this text to log file [ COMT_casecontrol1.log ]
Analysis started: Thu Aug 12 09:30:53 2010

Options in effect:
  --ped COMTcasecontrol1.txt
  --map Map1.txt
  --assoc
  --ci 0.95
  --out COMT_casecontrol1

1 (of 1) markers to be included from [ Map1.txt ]
438 individuals read from [ COMTcasecontrol1.txt ]
438 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
188 cases, 250 controls and 0 missing
334 males, 104 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 1 SNPs
438 founders and 0 non-founders found
0 of 438 individuals removed for low genotyping ( MIND > 0.1 )
Total genotyping rate in remaining individuals is 1
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 0.1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0.01 )
After frequency and genotyping pruning, there are 1 SNPs
writing main association results to [ COMT_casecontrol1.assoc ]

Analysis finished: Thu Aug 12 09:30:53 2010

```

**รูปที่ 21** แสดงการทำงานบน command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบแอลลีลรูปแบบคำสั่ง --assoc

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR	L95	U95
22	rs4680	100	A	0.3191	0.316	G	0.009823	0.9211	1.015	0.7612	1.352

**รูปที่ 22** แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบแอลลีลรูปแบบชุดคำสั่ง --assoc

## คำอธิบาย

- |  |   |
|--|---|
| (1) CHR (Chromosome)   | ตำแหน่งโครโมโซมของสไนปส์  |
| (2) SNP (SNP ID)   | ระบุชื่อของตำแหน่งสไนปส์  |
| (3) BP (Base-pair position)                                      | ระยะห่างของลำดับคู่เบส  |
| (4) A1 (Minor allele name)                                       | ชื่อแอลลีลที่พบน้อยจากการศึกษา  |
| (5) F_A (Frequency of this allele in case)                       | ความถี่ของแอลลีลที่พบน้อยจาก<br>กลุ่มผู้ป่วย                                      |
| (6) F_U (Frequency of this allele in controls)                   | ความถี่ของแอลลีลที่พบน้อยจาก<br>กลุ่มประชากรปกติ                                  |
| (7) A2 (Major allele name)                                       | ชื่อแอลลีลที่พบบ่อยจากการศึกษา  |
| (8) CHISQ (Basic allelic test chi-square: 1df)                   | ค่าการทดสอบไคสแควร์   |
| (7) P (P-value for this test)                                    | ค่าความน่าจะเป็นจากกลุ่มตัวอย่างที่<br>ศึกษา                                      |
| (9) OR (Odd ratio)   | อัตราส่วนของโอกาสที่จะเกิด<br>เหตุการณ์หนึ่งต่อโอกาสที่จะไม่เกิด<br>เหตุการณ์นั้น |
| (10) L95 (Lower bound of 95% confidence interval for odds ratio) | ค่าต่ำสุดจากช่วงของความเชื่อมั่นที่<br>95% ของค่า Odd ratio                       |
| (11) U95 (Upper bound of 95% confidence interval for odds ratio) | ค่าสูงสุดจากช่วงของความเชื่อมั่นที่<br>95% ของค่า Odd ratio                       |

## ตัวอย่างการศึกษา

รูปแบบคำสั่ง	ไฟล์นำเข้า (Input file)	ไฟล์แผนที่ (Map file)	ไฟล์นำออก (Output file)
	COMTcasecontrol1.txt	Map1.txt	COMT_casecontrol1.txt
--model	คำสั่ง plink --ped COMTcasecontrol1.txt --map Map1.txt --model --out COMT_model1 (รูปที่ 23) และแสดงผลการวิเคราะห์ (รูปที่ 24)		

```

COMT_model1 - Notepad
File Edit Format View Help

@-----@
|          PLINK!          |          v1.00          |          05/Dec/2007          |
|-----|-----|-----|
| (C) 2007 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2 |
|-----|-----|-----|
| For documentation, citation & bug-report instructions: |
| http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/             |
|-----|-----|-----|
@-----@

web-based version check ( --noweb to skip )
Connecting to web... Problem reading from SNPServer
Problem connecting to web

Writing this text to log file [ COMT_model1.log ]
Analysis started: Thu Aug 12 09:32:22 2010

Options in effect:
  --ped COMTcasecontrol1.txt
  --map Map1.txt
  --model
  --out COMT_model1

1 (of 1) markers to be included from [ Map1.txt ]
438 individuals read from [ COMTcasecontrol1.txt ]
438 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
188 cases, 250 controls and 0 missing
334 males, 104 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 1 SNPs
438 founders and 0 non-founders found
0 of 438 individuals removed for low genotyping ( MIND > 0.1 )
Total genotyping rate in remaining individuals is 1
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 0.1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0.01 )
After frequency and genotyping pruning, there are 1 SNPs
Full-model association tests, minimum genotype count: --cell 5
Writing full model association results to [ COMT_model1.model ]

Analysis finished: Thu Aug 12 09:32:22 2010

```

รูปที่ 23 แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบจีโนไทป์รูปแบบคำสั่ง --model

CHR	SNP	TEST	AFF	UNAFF	CHISQ	DF	P
22	rs4680	GENO	21/78/89	19/120/111	2.707	2	0.2583
22	rs4680	TREND	120/256	158/342	0.01027	1	0.9193
22	rs4680	ALLELIC	120/256	158/342	0.009823	1	0.9211
22	rs4680	DOM	99/89	139/111	0.3739	1	0.5409
22	rs4680	REC	21/167	19/231	1.648	1	0.1992

รูปที่ 24 แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบจีโนไทป์รูปแบบชุดคำสั่ง --model

## คำอธิบาย

(1) CHR (Chromosome)	ตำแหน่งโครโมโซมของสไนปส์
(2) SNP (SNP ID)	ระบุชื่อของตำแหน่งสไนปส์
(3) TEST (Type of test)	ระบุชนิดของการศึกษา ดังนี้ GENO (Genotype) TREND (Cochran-Armitage trend test) ALLELIC (Allelic test) DOM (Dominant gene action test) REC (Recessive gene action test)
(4) AFF (Genotypes/alleles in cases)	จีโนไทป์/แอลลีลกลุ่มผู้ป่วย
(5) UNAFF (Genotypes/alleles in controls)	จีโนไทป์/แอลลีลกลุ่มประชากรปกติ
(6) CHISQ (Chi-square statistic)	ค่าการทดสอบไคสแควร์
(7) DF (Degrees of freedom for test)	ระดับชั้นแห่งความอิสระ
(8) P (P-value)	ค่าความน่าจะเป็นจากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

## ตัวอย่างการศึกษา

รูปแบบคำสั่ง	ไฟล์นำเข้า (Input file)	ไฟล์แผนที่ (Map file)	ไฟล์นำออก (Output file)
	COMTcasecontrol1.txt	Map1.txt	COMT_casecontrol1.txt
--logistic	คำสั่ง plink --ped COMTcasecontrol1.txt --map Map1.txt --logistic --ci 0.95 --out COMT_additive1 (รูปที่ 25) และแสดงผลการวิเคราะห์ (รูปที่ 26)		

```

COMT_additive1 - Notepad
File Edit Format View Help

@-----@
|          PLINK!          |          v1.00          |          05/Dec/2007          |
|-----|-----|-----|
| (C) 2007 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2 |
|-----|-----|-----|
| For documentation, citation & bug-report instructions: |
| http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/ |
|-----|-----|-----|
@-----@

Web-based version check ( --noweb to skip )
Connecting to web... Problem reading from SNPServer
Problem connecting to web

Writing this text to log file [ COMT_additive1.log ]
Analysis started: Thu Aug 12 09:31:42 2010

Options in effect:
  --ped COMTcasecontrol1.txt
  --map Map1.txt
  --logistic
  --ci 0.95
  --out COMT_additive1

1 (of 1) markers to be included from [ Map1.txt ]
438 individuals read from [ COMTcasecontrol1.txt ]
438 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
188 cases, 250 controls and 0 missing
334 males, 104 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 1 SNPs
438 founders and 0 non-founders found
0 of 438 individuals removed for low genotyping ( MIND > 0.1 )
Total genotyping rate in remaining individuals is 1
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 0.1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0.01 )
After frequency and genotyping pruning, there are 1 SNPs
Converting data to Individual-major format
Writing logistic model association results to [ COMT_additive1.assoc.logistic ]

Analysis finished: Thu Aug 12 09:31:42 2010

```

**รูปที่ 25** แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบจีโนไทป์รูปแบบคำสั่ง --logistic

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	BETA	SE	L95	U95	STAT	P
22	rs4680	100	A	ADD	438	1.015	0.1499	0.7568	1.362	0.1013	0.9193

**รูปที่ 26** แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์แบบจีโนไทป์รูปแบบชุดคำสั่ง --logistic

## คำอธิบาย

(1) CHR (Chromosome)	ตำแหน่งโครโมโซมของสไนปส์
(2) SNP (SNP ID)	ระบุชื่อของตำแหน่งสไนปส์
(3) BP (Base-pair position)	ระยะห่างของลำดับคู่เบส
(4) A1 (Minor allele name)	ชื่อแอลลีลที่พบได้น้อยจากการศึกษา
(5) TEST (Type of test)	ระบุชนิดของการศึกษา ADD (Additive)
(6) NMIS (Number of non-missing individuals included in analysis)	จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา
(7) BETA (Odds ratio (-logistic))	อัตราส่วนของโอกาสที่จะเกิด เหตุการณ์หนึ่งต่อโอกาสที่จะไม่เกิด เหตุการณ์นั้น
(8) L95 (Lower bound of 95% confidence interval for odds ratio)	ค่าต่ำสุดจากช่วงของความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่า Odd ratio
(9) U95 (Upper bound of 95% confidence interval for odds ratio)	ค่าสูงสุดจากช่วงของความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่า Odd ratio
(8) STAT (Coefficient t-statistic)	ค่าสัมประสิทธิ์จากการวิเคราะห์ด้วย t-statistic
(9) P (P-value for t-statistic)	ค่าความน่าจะเป็นจากกลุ่มตัวอย่างที่ ศึกษาจากการวิเคราะห์ t-statistic

**การใช้โปรแกรม PLINK วิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Family-based study**

ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของแอลลีลจากบิดามารดาไปยังลูกที่เป็นโรค (Transmitted; T) เปรียบเทียบกับแอลลีลจากบิดามารดาที่ไม่ได้ถ่ายทอดเป็นกลุ่มควบคุม (Not Transmitted; NT) ซึ่งค่าที่ได้กำหนดให้มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 ( $P < 0.05$ ) จึงถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้ใช้จะต้องมีไฟล์นำเข้า (Input) จีโนไทป์ของ

ครอบครัวผู้ป่วย ไฟล์แผนที่ (Map) และกำหนดชื่อไฟล์ Output โดยไฟล์ที่ศึกษามีทั้งหมด 3 ไฟล์ดังแสดงไว้ตอนต้น

### ตัวอย่างการศึกษา

ไฟล์นำเข้า (Input file)	ไฟล์แผนที่ (Map file)	ไฟล์นำออก (Output file)
COMTtdt1.txt	Map.txt	COMT_tdt1.txt
คำสั่ง plink --ped COMTtdt1.txt --map Map.txt --tdt --out COMT_tdt1 (รูปที่ 27) และแสดงผลการวิเคราะห์ (รูปที่ 28)		

```

COMT_tdt1 - Notepad
File Edit Format View Help
-----@-----
          PLINK!          |          v1.00          |          05/Dec/2007          |
-----@-----
(C) 2007 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
For documentation, citation & bug-report instructions:
http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----@-----

Web-based version check ( --noweb to skip )
Connecting to web... Problem reading from SNPServer
Problem connecting to web

writing this text to log file [ COMT_tdt1.log ]
Analysis started: Thu Aug 12 09:34:02 2010

Options in effect:
  --ped COMTtdt1.txt
  --map Map.txt
  --tdt
  --ci 0.95
  --out COMT_tdt1

2 (of 2) markers to be included from [ Map.txt ]
480 individuals read from [ COMTtdt1.txt ]
480 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
160 cases, 320 controls and 0 missing
294 males, 186 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 2 SNPs
Converting data to SNP-major format
320 founders and 160 non-founders found
0 of 480 individuals removed for low genotyping ( MIND > 0.1 )
Total genotyping rate in remaining individuals is 1
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 0.1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0.01 )
Converting data to Individual-major format
After frequency and genotyping pruning, there are 2 SNPs
160 nuclear families, 0 founder singletons found
160 non-founders with 2 parents in 160 nuclear families
0 non-founders without 2 parents in 0 nuclear families
160 affected offspring trios
0 phenotypically discordant parent pairs found
0 Mendel errors detected in total
writing TDT results (asymptotic) to [ COMT_tdt1.tdt ]

```

รูปที่ 27 แสดงการทำงานบน Command Prompt เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์การถ่ายทอดภายในครอบครัวรูปแบบคำสั่ง --tdt



CHR	SNP	A1:A2	T:U_TDT	OR_TDT	L95	U95	CHISQ_TDT	P_TDT
22	rs4818	G:C	71:76	0.9342	0.676	1.291	0.1701	0.6801
22	rs4680	A:G	75:64	1.172	0.8395	1.636	0.8705	0.3508

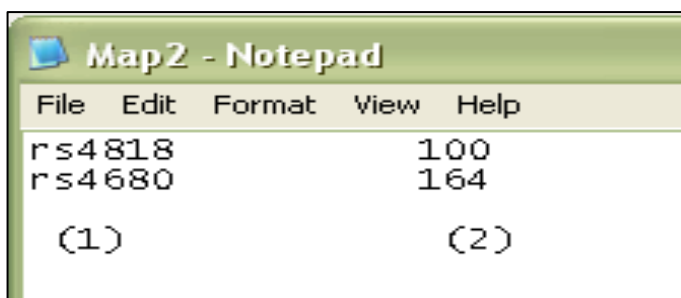
**รูปที่ 28** แสดงผลการวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์การถ่ายทอดภายในครอบครัวรูปแบบคำสั่ง --tdt

### คำอธิบาย

- |  |   |
|--|---|
| (1) CHR (Chromosome number)  | ตำแหน่งโครโมโซมของสไนป์ส์   |
| (2) SNP (SNP ID)   | ระบุชื่อของตำแหน่งสไนป์ส์   |
| (3) A1:A2 (Minor and major allele code)                                  | ชื่อแอลลีลที่พบน้อย: แอลลีลที่พบมากจากการศึกษา                            |
| (4) T:U_TDT (Transmitted minor allele count: Untransmitted allele count) | ถ่ายทอดจำนวนแอลลีลที่พบน้อย: จำนวนแอลลีลที่ไม่ถ่ายทอด                     |
| (5) OR_TDT (TDT odds ratio)  | อัตราส่วนของโอกาสที่จะเกิดเหตุการณ์หนึ่งต่อโอกาสที่จะไม่เกิดเหตุการณ์นั้น |
| (6) L95 (Lower bound of 95% confidence interval for TDT odds ratio)      | ค่าต่ำสุดจากช่วงของความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่า Odd ratio                  |
| (7) U95 (Upper bound of 95% confidence interval for TDT odds ratio)      | ค่าสูงสุดจากช่วงของความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่า Odd ratio                  |
| (9) CHISQ_TDT (TDT Chi-square statistic)                                 | ค่าการทดสอบไคสแควร์   |
| (8) P_TDT (TDT P-value)  | ค่าความน่าจะเป็นจากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา                                  |

## การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรมแฮพลอวิว (Haploview)

การนำเข้าข้อมูล (Input) ผู้ใช้งานสามารถนำเข้าข้อมูลได้ 5 ลักษณะ คือ รูปแบบ Standard Linkage รูปแบบ Hapmap รูปแบบ PHASE และรูปแบบ PLINK ซึ่งการใช้รูปแบบข้อมูลนำเข้าจะใช้รูปแบบ PLINK ดังที่ได้ใช้รูปแบบดังกล่าวในการศึกษาความสัมพันธ์ ตอนต้น ส่วนไฟล์แผนที่ (Map) จะใช้เป็นรูปแบบไฟล์ Marker information ภายในไฟล์จะประกอบด้วย 2 คอลัมน์ (รูปที่ 29)



File	Edit	Format	View	Help
rs4818			100	
rs4680			164	
(1)			(2)	

รูปที่ 29 แสดงแผนที่ (Map) ที่ระบุถึงตำแหน่งของสไนปส์ที่ต้องการศึกษาสำหรับโปรแกรมแฮพลอวิว

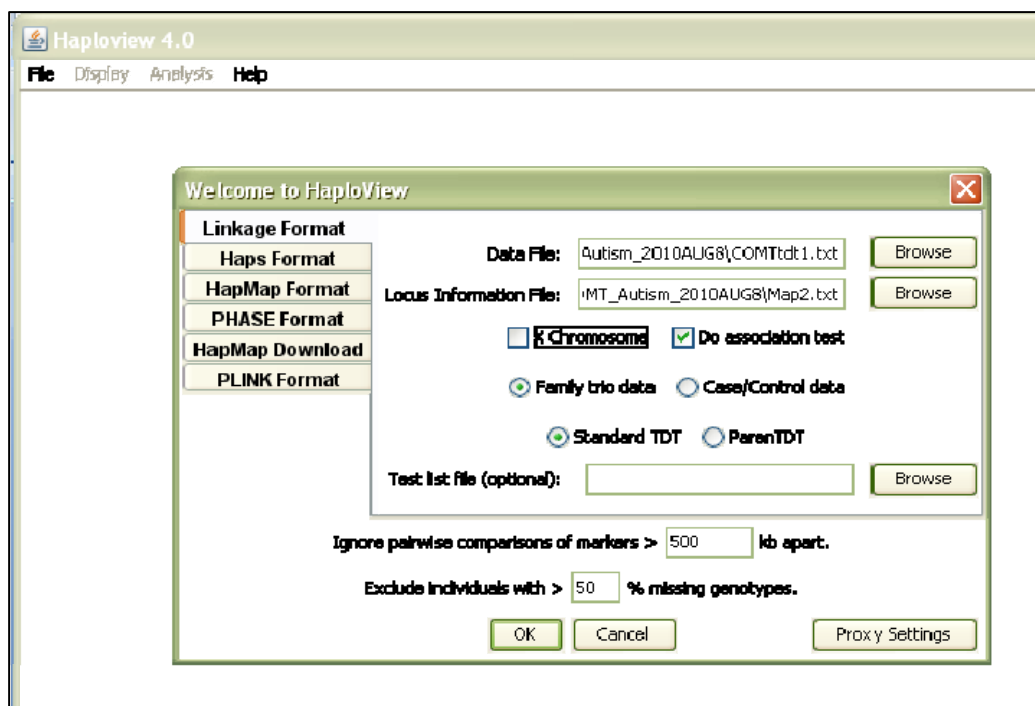
### คำอธิบาย

- |                |   |
|----------------|---|
| (1) Maker name | ชื่อของตำแหน่งสไนปส์  |
| (2) Position   | ระยะห่างของลำดับคู่เบส สำหรับการศึกษแบบ Family-based study มีตำแหน่งสไนปส์ rs4818 และ rs4680 ตามลำดับ |

โปรแกรมจะทำการคำนวณเฉพาะสถิติ Pairwise LD สำหรับตำแหน่งที่มีการกำหนดระยะห่างระหว่างตำแหน่งตั้งค่าไว้ที่ 500 กิโลเบส โปรแกรมจะไม่ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีผลจีโนไทป์ไม่ถึงร้อยละ 50

## การใช้โปรแกรม HaploView 4.0

1. เปิดโปรแกรมแฮพลอวิวขึ้นมา โดยสามารถเรียกใช้งานผ่าน Shortcut ที่หน้าจอ (Desktop) หรือจาก Start Menu > Programes > HaploView > HaploView



รูปที่ 30 แสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมแฮพลอวิว 4.0

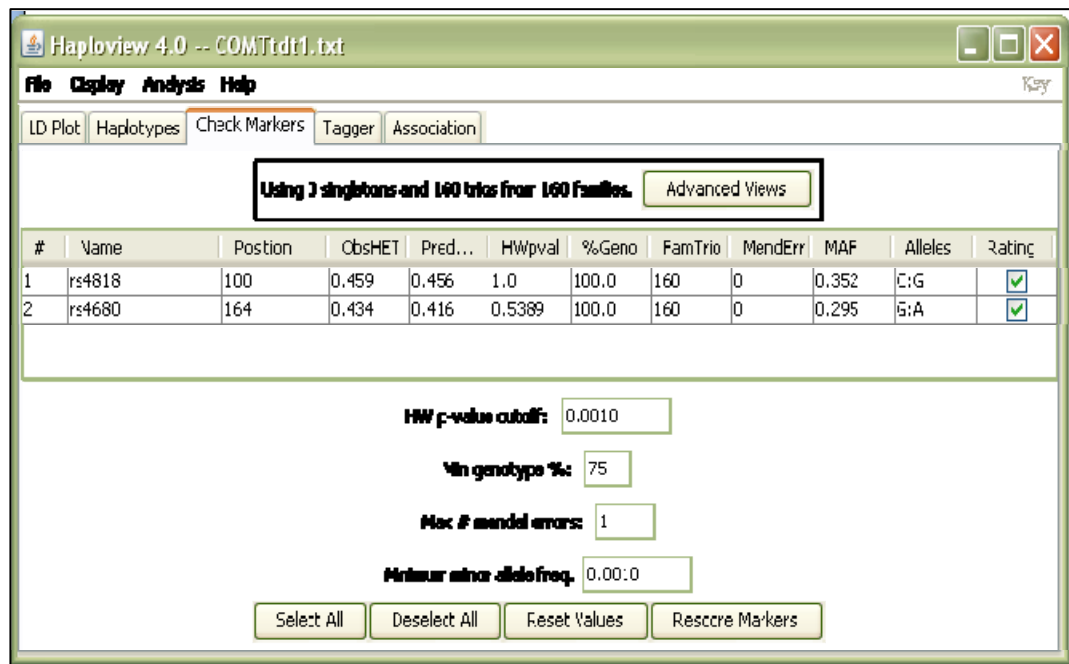
2. เลือกไฟล์นำเข้าข้อมูลที่ต้องการนำมาศึกษา จากการเลือก Browse ของ Data File และเลือก Marker information จากการ Browse ของ Locus Information File จากนั้นเลือก Do association test > Family trio data > Standard TDT และจิ้มกด OK โปรแกรมจะวิเคราะห์ข้อมูลอย่างอัตโนมัติ

### ตัวอย่างการศึกษา

ไฟล์นำเข้า (Input file)	ไฟล์แผ่นที่ (Marker information)
COMTtdt1.txt	Map2.txt

## ผลการศึกษาจากโปรแกรม HaploView 4.0

1. การตรวจสอบคุณสมบัติของตำแหน่งสไนป์ส์ (Check Markers) โปรแกรม จะทำการคำนวณข้อมูลพื้นฐานของแต่ละตำแหน่งสไนป์ส์และรายงานผลสำหรับการตรวจสอบ คุณสมบัติต่างๆ (รูปที่ 31)



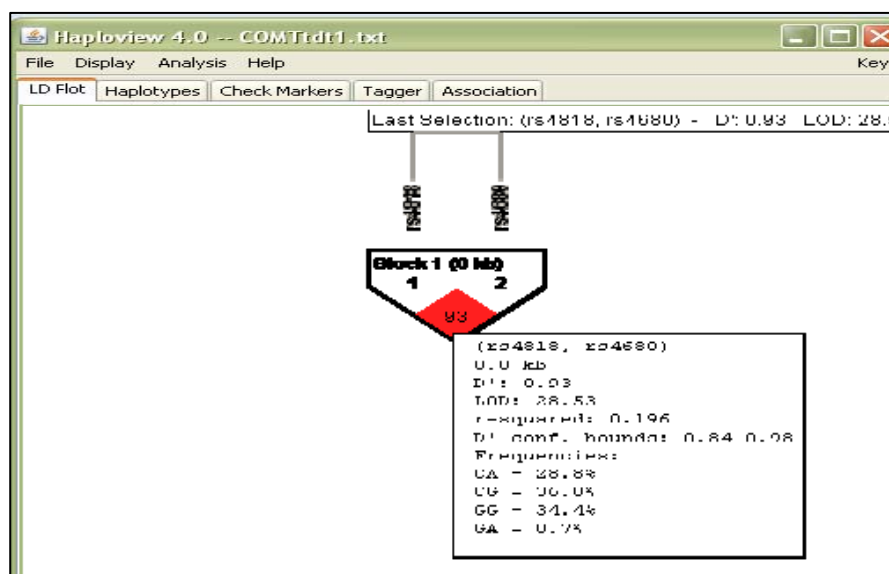
รูปที่ 31 แสดงผลการวิเคราะห์จากการตรวจสอบคุณสมบัติของตำแหน่งสไนป์ส์

### คำอธิบาย

- |              |  |
|--------------|--|
| (1) #        | เลขที่ตำแหน่งสไนป์ส์   |
| (2) Name     | ชื่อสไนป์ส์จากไฟล์ Marker information  |
| (3) Position | ตำแหน่งของสไนป์ส์จากไฟล์ Marker information  |
| (4) ObsHET   | ค่าที่ได้จากการนับ Observed heterozygosity   |
| (5) PredHET  | ค่าที่ได้จากการคำนวณ Predicted heterozygosity<br>( $2 * MAF * (1 - MAF)$ )   |
| (6) HWpval   | ค่า P-value ของ Hardy-Weinberg equilibrium ซึ่งก็คือค่า<br>โอกาสความน่าจะเป็นที่ข้อมูลจีโนไทป์นี้มีการกระจายแบบ<br>สมดุล |

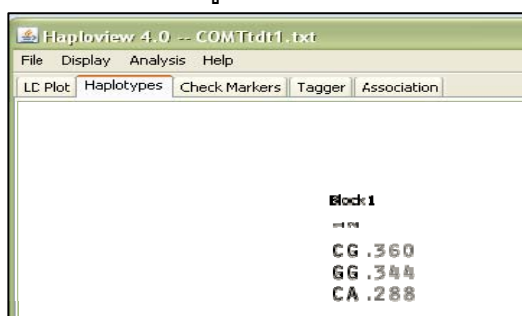
- (7) %Geno ค่าเปอร์เซ็นต์ของการศึกษาจีโนไทป์ที่ได้ผลของแต่ละตำแหน่งสนิปส์
- (8) FamTrio จำนวนของครอบครัวที่มีผลจีโนไทป์ครบ
- (9) MendErr จำนวนครอบครัวที่มีผลจีโนไทป์ไม่ครบไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล
- (10) MAF ค่า minor allele frequency ของแต่ละแอลลีล
- (11) Allele แสดง Major และ Minor ของสนิปส์แต่ละตำแหน่ง
- (12) Rating ค่าที่บอกให้โปรแกรมวิเคราะห์ผล ถ้ามีเครื่องหมายถูกอยู่ แสดงว่าตำแหน่งสนิปส์นั้นผ่านการทดสอบ แต่ถ้าไม่มี แสดงว่าตำแหน่งสนิปส์นั้นไม่ผ่านการทดสอบ

2. การวิเคราะห์ Linkage disequilibrium (LD Plot) การศึกษาว่าตำแหน่งสนิปส์ที่อยู่ใกล้กันมีโอกาสถ่ายทอดไปด้วยกันมากกว่าหรือน้อยกว่าค่าคาดหวัง ซึ่งพิจารณาจากค่า Lewontin's coefficient ( $D'$ ) ที่คำนวณจากระยะทางและความถี่แอลลีลของแต่ละคู่สนิปส์ หากค่า  $D'$  มากกว่า 0.8 หมายความว่า มีการถ่ายทอดไปด้วยกันของกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมได้บ่อยจนถือว่ามี Linkage disequilibrium ที่จะวิเคราะห์ว่าเป็น LD block เดียวกัน ค่าที่แสดงออกมาประกอบด้วยคู่ของตำแหน่งสนิปส์ที่ใช้ในการคำนวณต่างๆ ระยะห่างเป็น คู่เบส ค่า  $D'$  ค่า LOD score ค่า  $r$  square ค่า  $D'$  confidence bound และเปอร์เซ็นต์จีโนไทป์แต่ละแบบตามลำดับ (รูปที่ 32)



รูปที่ 32 แสดงผลการวิเคราะห์ Linkage disequilibrium (LD Plot)

3. การวิเคราะห์บล็อก (Blocks) และแฮพลไทป์ (Haplotype) โปรแกรมสามารถสร้าง Haplotype block ได้หลายแบบ การศึกษานี้เลือกรูปแบบ Confidence intervals เป็นรูปแบบเริ่มต้น โปรแกรมจะตัดตำแหน่งสไนป์ส์ที่ศึกษาที่มีค่า  $MAF < 0.05$  ออกและจะทำการคำนวณค่า  $D'$  confidence bound ที่ 95% ส่วนการแสดงผลแฮพลไทป์ในแต่ละบล็อกจะประกอบด้วยความถี่ของแฮพลไทป์ในแต่ละแฮพลไทป์และเส้นเชื่อมโยงจากบล็อกหนึ่งไปอีกบล็อกหนึ่งที่อยู่ติดกันหากมีหลายบล็อกของสไนป์ส์หลายตำแหน่ง โปรแกรมจะแสดงเฉพาะแฮพลไทป์หรือแอลลีลที่มีการแสดงออกมาที่หน้าจอเท่านั้น หากแฮพลไทป์หรือแอลลีลมีจำนวนน้อยจะไม่นำมาใช้ในการคำนวณ (รูปที่ 33)



รูปที่ 33 แสดงผลการวิเคราะห์บล็อก (Blocks) และแฮพลไทป์ (Haplotype)

4. การวิเคราะห์การศึกษาความสัมพันธ์ โปรแกรมแฮพลิวสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทั้งแบบสไนป์ส์ตำแหน่งเดียว (รูปที่ 34) หรือสไนป์ส์หลายๆ ตำแหน่ง (รูปที่ 35) ได้ สำหรับข้อมูล Population-based case control study โปรแกรมจะคำนวณหาค่าไคสแควร์และค่า P-value จากข้อมูลความถี่ของแอลลีล ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Family-based study เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ โปรแกรมจะคำนวณหาค่าอัตราการถ่ายทอดและไม่ถ่ายทอด ค่าไคสแควร์และค่า P-value จากการศึกษาภายในครอบครัว

#	Name	Overtransmitted	T:U	Chi Square	p value
1	rs4818	C	76:71	0.17	0.6801
2	rs4680	A	75:64	0.671	0.3508

รูปที่ 34 แสดงผลการศึกษาความสัมพันธ์ของสไนป์ส์ตำแหน่งเดียว

Haplotype	Freq.	T:U	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
CG	0.360	65.1 : 69.3	0.128	0.72
GG	0.344	69.9 : 76.7	0.32	0.5719
CA	0.288	71.9 : 62.7	0.623	0.4301

รูปที่ 35 แสดงผลการศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์หลายๆ ตำแหน่ง

#### คำอธิบาย

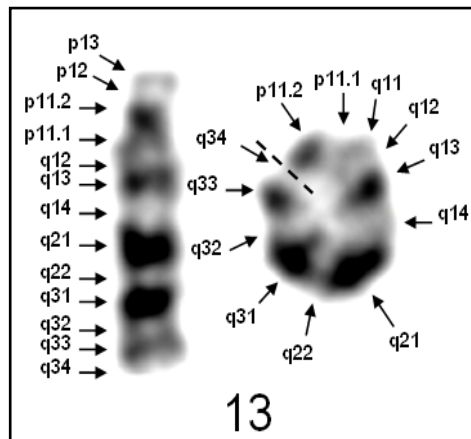
- |                     |   |
|---------------------|---|
| (1) #               | เลขที่ตำแหน่งสลิปส์                           |
| (2) Name            | ชื่อสลิปส์จากไฟล์ Marker information          |
| (3) Overtransmitted | แอลลีลที่มีการถ่ายทอดมาก                      |
| (4) T:U             | อัตราการถ่ายทอดไม่ถ่ายทอด                     |
| (5) Chi Square      | ค่าการทดสอบไคสแควร์                           |
| (6) P value         | ค่าความน่าจะเป็นจากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา      |
| (7) Haplotype       | บล็อกแต่ละรูปแบบที่พบของตำแหน่งสลิปส์ที่ศึกษา |
| (8) Freq.           | ความถี่ของตำแหน่งสลิปส์ที่ศึกษา               |

### บทที่ 3 ผลการวิจัย

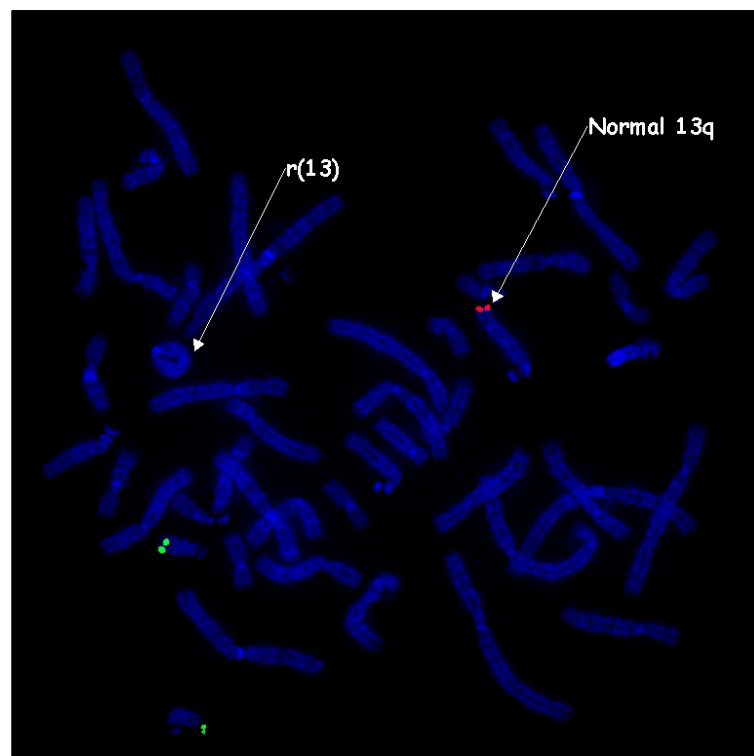
#### การตรวจกรองความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี GTG-banding

ผลการตรวจโครโมโซมในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจำนวน 203 ราย พบความผิดปกติในผู้ป่วยชาย 1 ราย มีโครโมโซมแบบ 46,XY,r(13)(p11.2q34) (รูปที่ 36) ผู้ป่วยอายุ 4 ปี ผู้ปกครองพามาพบแพทย์ด้วยเรื่องไม่พูด ชนอยู่ไม่นิ่ง ไม่เคยชัก ขนาดศีรษะปกติ (48 เซนติเมตร เปอร์เซ็นไทล์ที่ 10-25) ไม่มีใบหน้าผิดปกติหรือความพิการแต่กำเนิด แต่มีอาการเข้าได้กับออทิซึมสเปกตรัมแบบ PDD-NOS ผลการทดสอบสติปัญญาด้วยแบบทดสอบ Stanford-Binet Intelligence Scale: Fifth Edition (SB:V) แบบไม่ใช้ภาษาอยู่ในระดับภาวะปัญญาอ่อนเล็กน้อย (IQ = 60) ในการวิเคราะห์โครโมโซมของผู้ป่วยรายนี้จำนวน 27 เซลล์ พบความผิดปกติแบบวงแหวนของโครโมโซม 13 (r13) จำนวน 1 แห่งในทุกเซลล์ที่นำมาศึกษา กลไกการเกิดโครโมโซมแบบวงแหวนเกิดจากการแตกหักและปลายทั้งสองข้างขาดหายไปแล้วเชื่อมต่อกัน การย้อม GTG-banding เพียงอย่างเดียวไม่สามารถระบุตำแหน่งที่ชัดเจนของบริเวณที่ขาดหายไป จึงย้อมสีโครโมโซมเพิ่มเติมด้วยเทคนิค QFQ-banding ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ปรากฏส่วนของเฮเทอโรโครมาตินเข้มกว่าส่วนอื่นๆ ของโครโมโซม โดยผลการย้อมในโครโมโซม 13 ปรากฏแถบเฮเทอโรโครมาติน ครบทุกแถบและเมื่อย้อมโครโมโซมด้วยเทคนิค NOR-banding ซึ่งเป็นการย้อมส่วนของ Nucleolus organizer region ย้อมไม่ติดสีซิลเวอร์ในโครโมโซม 13 ที่เกิดวงแหวนเนื่องจากการแตกหักและขาดหายไปบริเวณปลายของ Nucleolus organizer region ตำแหน่ง p12-p13 จึงย้อมไม่ติดสี NOR และต้องมีการขาดหายไปบริเวณปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม 13 ตำแหน่ง q34ter ร่วมด้วยจึงทำให้เกิดโครโมโซมแบบวงแหวนขึ้นและยืนยันการตรวจเพิ่มเติมด้วยเทคนิค Fluorescence In situ Hybridization (FISH) ใช้โพรบ (Probe) ตำแหน่ง q34ter จากศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล พบว่ามีส่วนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม 13 ตำแหน่ง q34ter จำนวน 1 แห่ง ขาดหาย (รูปที่ 37)





**รูปที่ 36** แสดงความผิดปกติของโครโมโซม 13 แบบวงแหวนในผู้ป่วยออกซิซึมสเปคตรัมแบบ PDD-NOS เพศชายจากการย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิค GTG-banding ลูกศรแสดงตำแหน่งบนโครโมโซม เส้นประแสดงรอยต่อระหว่างแขนข้างสั้นและแขนข้างยาวของโครโมโซมที่มาเชื่อมต่อกัน

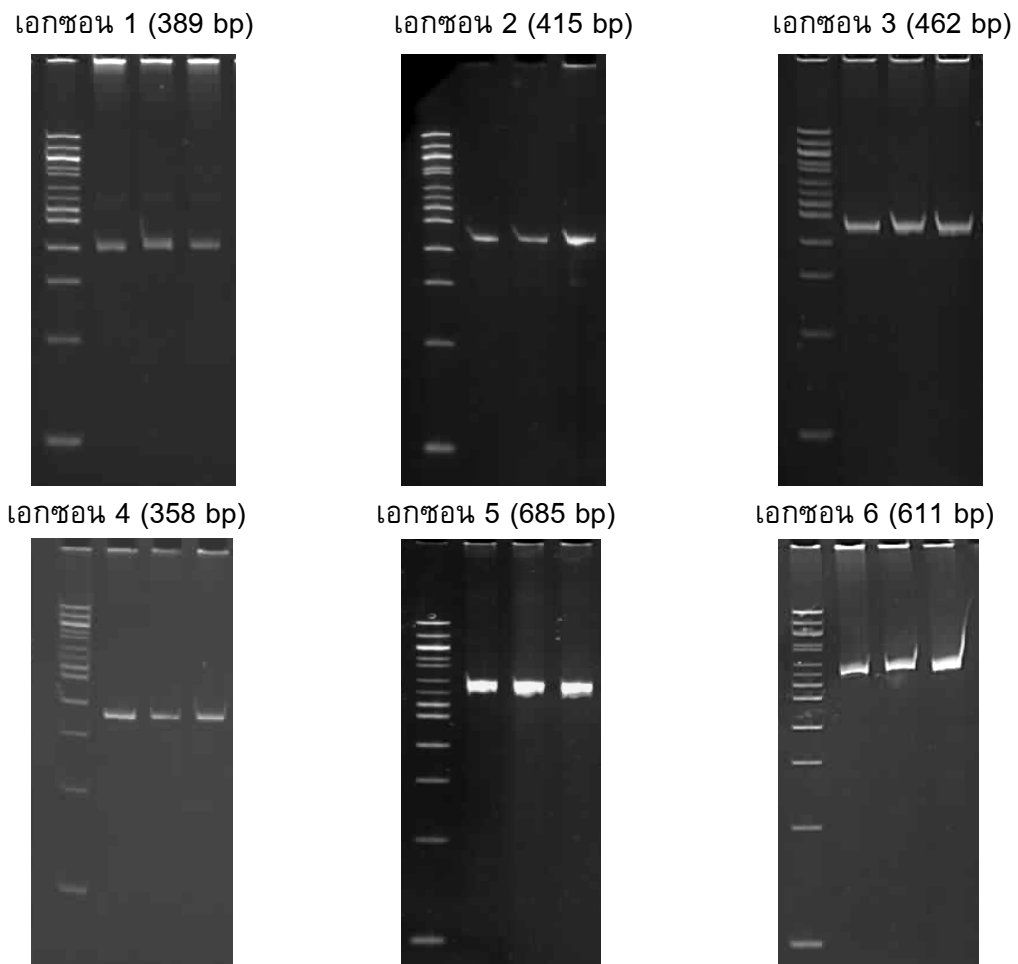


**รูปที่ 37** แสดงการตรวจโครโมโซมด้วยเทคนิค FISH เพื่อยืนยันผลของการขาดหายไปบริเวณปลายของ q34 ของโครโมโซม 13 แบบวงแหวน  
(เทคนิคจากศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล กรุงเทพฯ)

## การตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน *COMT*

### ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

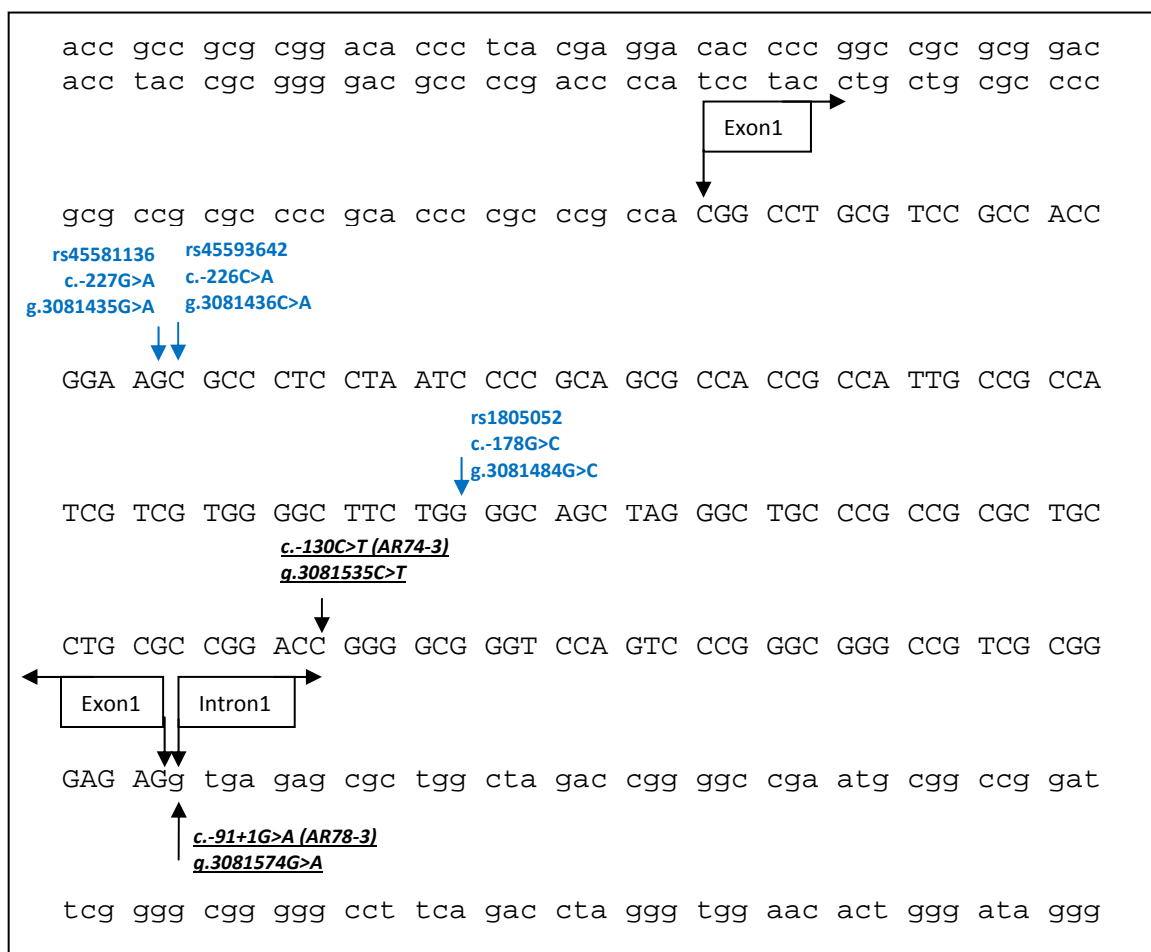
การตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน *COMT* ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมใช้วิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์และการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจกรองยีน *COMT* ทั้ง 6 เอกซอน ซึ่งตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสก่อนนำไปตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 38)



รูปที่ 38 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ 6 คู่ บนยีน *COMT* เอกซอน 1-6 ตามลำดับ

### การตรวจกรองการกลายพันธุ์เอกซอน 1 บนยีน *COMT*

การตรวจกรองความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 1 ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม นอกจากนี้จากการตรวจกรองยังพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม จำนวน 2 ราย (รูปที่ 39 ตารางที่ 10 และแสดงส่วนของการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบบนยีน *COMT*)



รูปที่ 39 แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 1 บนยีน *COMT* จาก Accession number: NT\_011519.10 และ NM\_000754.3 (สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553) อักษรตัวเอียงที่เขียนเส้นใต้แสดงตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วย 2 ราย คือ c.-130C>T และ c.-91+1G>A (หรือ IVS1+1G>A)

**ตารางที่ 10** แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับความถี่แอลลีลจากกลุ่มประชากรอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553 (จำนวนผู้ป่วย 173 ราย)

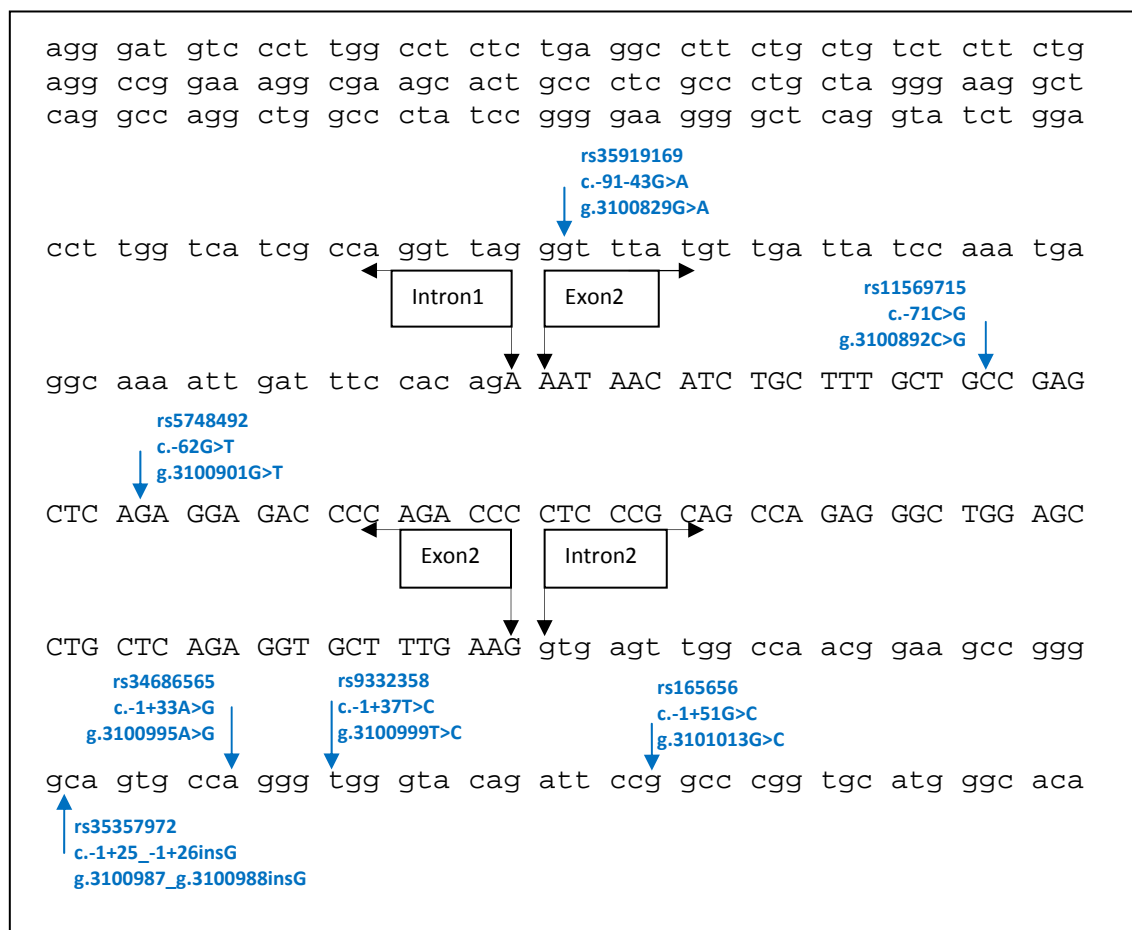
SNPs ID	แอลลีล	บริเวณ	ความถี่แอลลีล					
			เด็กไทยออทิซึม	ไทย	จีน	ญี่ปุ่น	ยุโรป	แอฟริกัน ชับ-ซาฮารา
rs45581136	A/G	เอกซอน 1	173 G(1), A(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45593642	A/C	เอกซอน 1	173 C(1), A(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs1805052	C/G	เอกซอน 1	173 G(1),C(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

**หมายเหตุตารางที่ 10 - 15** มีคำอธิบายตารางดังนี้

1. ความถี่แอลลีลของเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม (Thai Children with ASD) มาจากการคำนวณ
2. ตำแหน่งสนิปส์ที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมจะกำหนดแถบสีและพิมพ์ตัวหนา
3. ความถี่แอลลีลของคนไทยจากฐานข้อมูล ThaiSNP Database
4. ตัวเลขจำนวนเต็มแสดงจำนวนในแต่ละกลุ่มประชากรที่ศึกษา
5. ความถี่ของแอลลีลจากกลุ่มประชากรชาวจีน (China) ชาวญี่ปุ่น (Japan) ชาวยุโรป (European) และชาวแอฟริกัน ชับ-ซาฮารา (Sub-Saharan African) มาจากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap
6. N/A = Not Available

## การตรวจกรองการกลายพันธุ์เอกซอน 2 บนยีน *COMT*

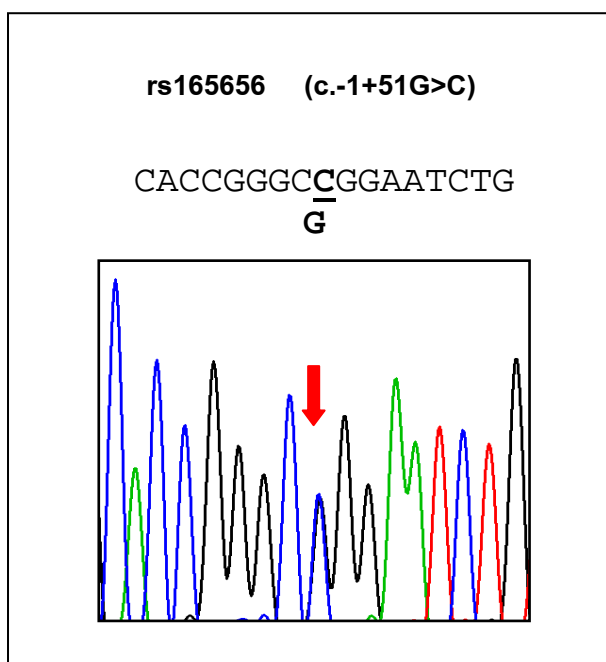
การตรวจกรองความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 2 ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน สามารถตรวจดูลำดับเบสได้ทั้งบริเวณเอกซอน 2 และอินทรอน 1 และ 2 บางส่วน พบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอซึ่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมและเคยมีรายงานแล้ว (Known polymorphism) ตำแหน่ง rs165656 (c.-1+51G>C) หรือ IVS2+51G>C บริเวณอินทรอน 2 ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นๆ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม (รูปที่ 40 และ 41 และตารางที่ 11)



รูปที่ 40 แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 2 บนยีน *COMT* จาก Accession number: NT\_011519.10 และ NM\_000754.3 (สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553)

ตารางที่ 11 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 2 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับความถี่แอลลีลจากกลุ่มประชากรอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553 (จำนวนผู้ป่วย 173 ราย)

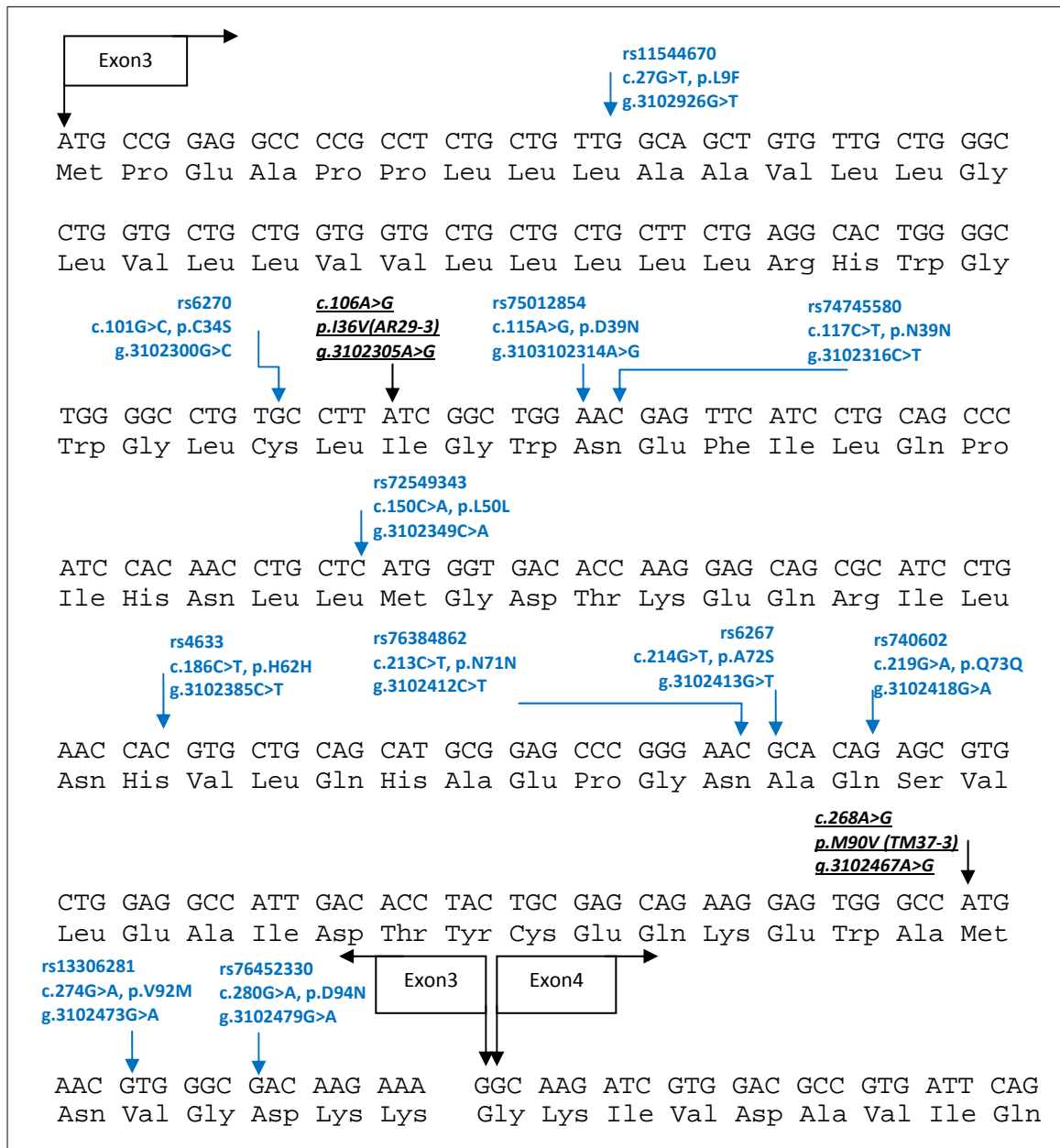
SNPs ID	แอลลีล	บริเวณ	ความถี่แอลลีล					
			เด็กไทยออทิซึม	ไทย	จีน	ญี่ปุ่น	ยุโรป	แอฟริกัน ซับ-ซาสาร่า
rs35919169	A/G	อินทรอน 1	173 G(1), A(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11569715	G/C	เอกซอน 2	173 C(1), G(0)	N/A	43 C(1), G(0)	43 C(1), G(0)	55 C(1), G(0)	55 C(0.96), G(0.04)
rs5748492	T/G	เอกซอน 2	173 G(1), T(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35357972	insG/-	อินทรอน 2	173 No insG(1), insG(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34686565	GA	อินทรอน 2	173 A(1), G(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332358	C/T	อินทรอน 2	173 T(1), C(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>rs165656</b>	<b>C/G</b>	<b>อินทรอน 2</b>	<b>173 G(0.679), C(0.321)</b>	<b>N/A</b>	<b>44 G(0.77), C(0.28)</b>	<b>42 G(0.80), C(0.20)</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>



**รูปที่ 41** แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่ง rs165656 (c.-1+51G>C) นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอยีน *COMT* บริเวณอินทอน 2 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้น Reverse อิเล็กโตรเฟอโรแกรม ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม ลูกศรแสดงตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม

### การตรวจกรองการกลายพันธุ์เอกซอน 3 บนยีน *COMT*

การตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 3 พบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ 3 แบบ ซึ่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมและเคยมีรายงานแล้ว ได้แก่ rs74745580 (c.117C>T หรือ p.N39N), rs4633 (c.186C>T หรือ p. H62H) และ rs6267 (c.463G>T หรือ p. A72S) ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นๆ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม นอกจากนี้จากการตรวจกรองยังพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม จำนวน 2 ราย (รูปที่ 42 และ 43 ตารางที่ 12 และแสดงส่วนของการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบบนยีน *COMT*)

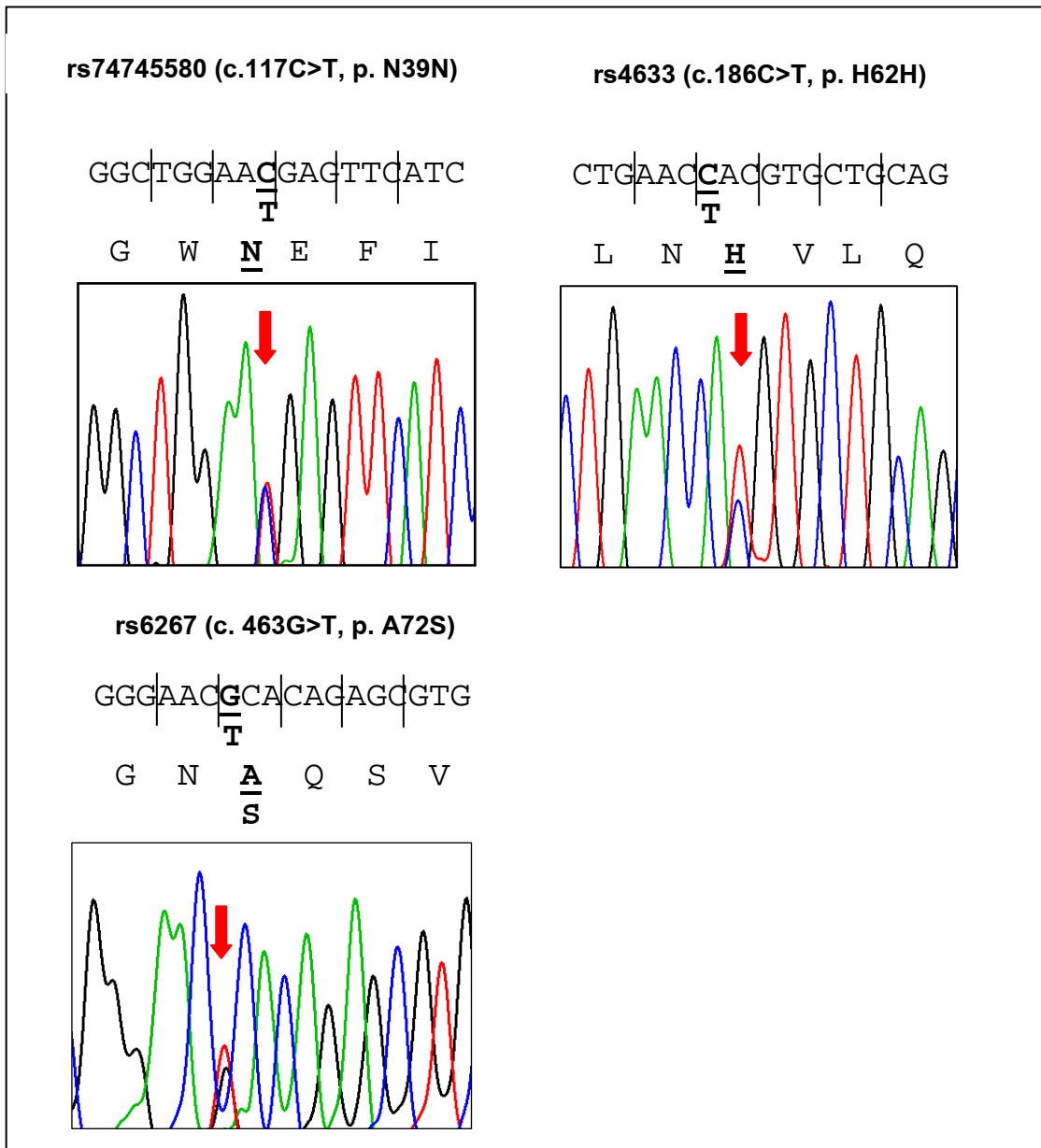


รูปที่ 42 แสดงแผนที่สลับจากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 3 บนยีน COMT จาก Accession number: NT\_011519.10 และ NM\_000754.3 (สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553) อักษรตัวเอียงที่เขียนเส้นใต้แสดงตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วย 2 ราย คือ c.106A>G และ c.268A>G



ตารางที่ 12 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 3 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับความถี่แอลลีลจากกลุ่มประชากรอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553 (จำนวนผู้ป่วย 173 ราย)

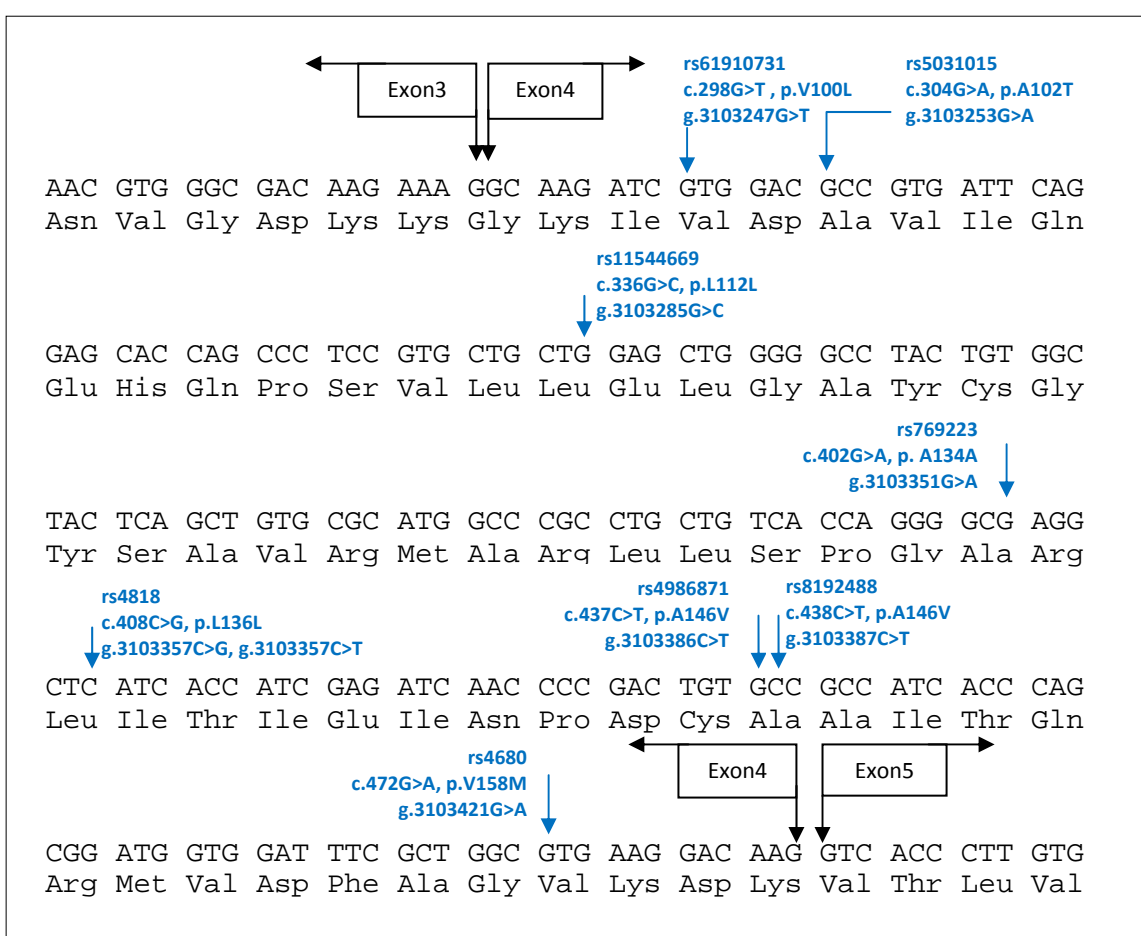
SNPs ID	แอลลีล	กรดอะมิโนเปลี่ยน	เปลี่ยนแปลงแบบ	ความถี่แอลลีล					
				เด็กไทยออทิซึม	ไทย	จีน	ญี่ปุ่น	ยุโรป	แอฟริกันชั้น-ซฮารา
rs11544670	T/G	Leu9Phe	Missense	173 G(1), T(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs6270	C/G	Cys34Ser	Missense	173 G(1), C(0)	N/A	44 G(1), C(0)	43 G(1), C(0)	56 G(1), C(0)	55 G(1), C(0)
rs75012854	GA	Asp39Asn	Missense	A(1), G(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>rs74745580</b>	<b>T/C</b>	<b>Asn39Asn</b>	<b>Synonymous</b>	<b>173 C(0.994), T(0.006)</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>	<b>N/A</b>
rs72549343	A/C	Leu50Leu	Synonymous	173 C(1), A(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>rs4633</b>	<b>T/C</b>	<b>His62His</b>	<b>Synonymous</b>	<b>173 C(0.691), T(0.309)</b>	<b>64 C(0.73), T(0.27)</b>	<b>81 C(0.71), T(0.29)</b>	<b>82 C(0.75), T(0.25)</b>	<b>110 C(0.52), T(0.48)</b>	<b>108 C(0.69), T(0.31)</b>
rs76384862	T/C	Asn71Asn	Synonymous	173 C(1), T(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>rs6267</b>	<b>T/G</b>	<b>Ala72Ser</b>	<b>Missense</b>	<b>173 G(0.986), T(0.014)</b>	<b>64 G(0.98), T(0.02)</b>	<b>81 G(0.94), T(0.06)</b>	<b>78 G(0.94), T(0.06)</b>	<b>108 G(0.99), T(0.01)</b>	<b>104 G(0.99), T(0.01)</b>
rs740602	GA	Gln73Gln	Synonymous	173 G(1), A(0)	N/A	38 G(1), A(0)	39 G(1), A(0)	N/A	53 G(0.75), A(0.25)
rs13306281	A/G	Val92Met	Missense	173 G(1), A(0)	N/A	41 G(1), A(0)	40 G(1), A(0)	53 G(1), A(0)	51 G:1, A(0)
rs76452330	A/G	Asp94Asn	Missense	173 G(1), A(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A



รูปที่ 43 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่ง rs74745580 (c.117C>T หรือ p.N39N), rs4633 (c.186C>T หรือ p. H62H) และ rs6267 (c.463G>T หรือ p. A72S) นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอยีน COMT เอกซอน 3 โดยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ อิเล็กโตรโพรแกรมตามลำดับ ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม ลูกศรแสดง ตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม

### การตรวจกรองการกลายพันธุ์เอกซอน 4 บนยีน *COMT*

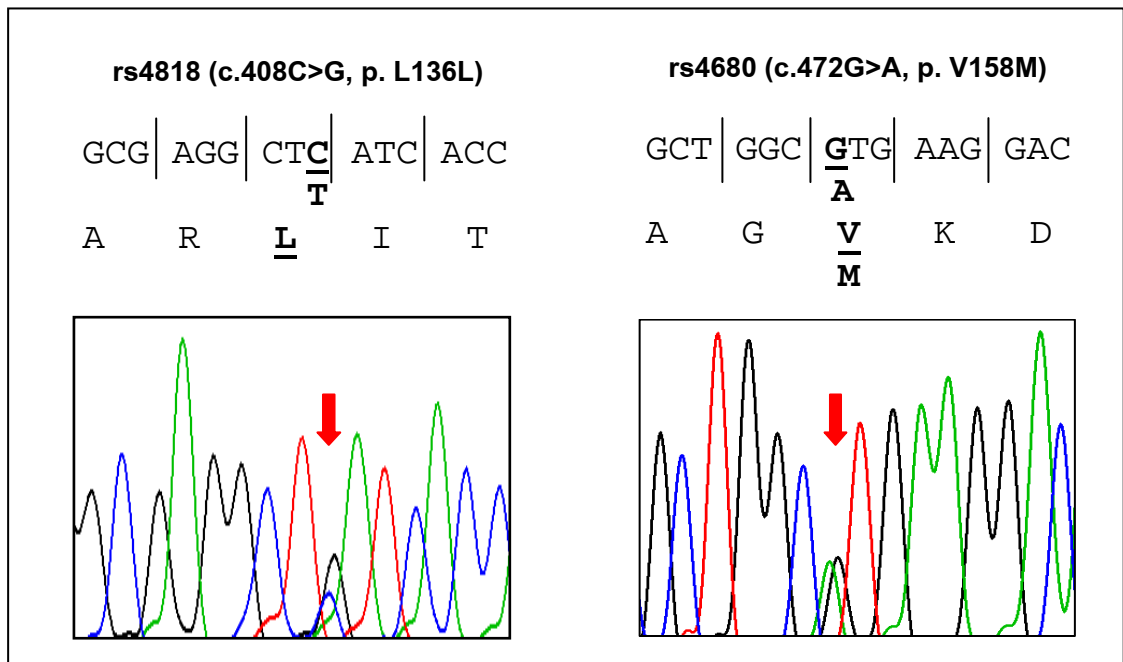
การตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 4 พบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ 2 แบบ ซึ่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมและเคยมีรายงานแล้ว ได้แก่ตำแหน่ง rs4818 (c.408C>G หรือ p. L136L) และ rs4680 (c.472G>A หรือ p. V158M) ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นๆ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในเด็กไทยที่เป็น ออทิสซึมสเปคตรัม (รูปที่ 44 และ 45 และตารางที่ 13)



รูปที่ 44 แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 4 บนยีน *COMT* จาก Accession number: NT\_011519.10 และ NM\_000754.3 (สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553)

ตารางที่ 13 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* ในเอกซอน 4 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับความถี่แอลลีลจากกลุ่มประชากรอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553 (จำนวนผู้ป่วย 173 ราย)

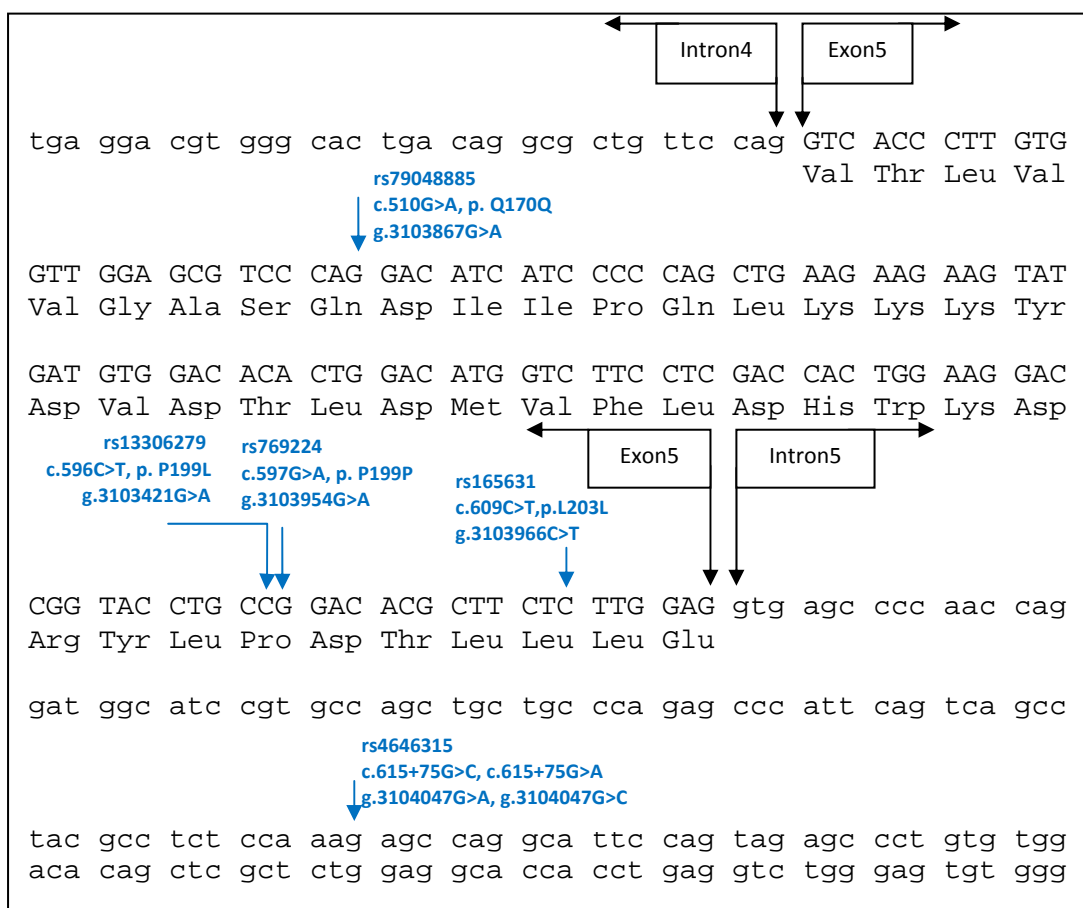
SNPs ID	แอลลีล	กรดอะมิโน เปลี่ยน	เปลี่ยนแปลง แบบ	ความถี่แอลลีล					
				เด็กไทยออทิซึม	ไทย	จีน	ญี่ปุ่น	ยุโรป	แอฟริกัน ซับ- ซาสาร่า
rs61910731	T/G	Val/Leu	Missense	173 G(1), T(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5031015	A/G	Ala/Thr	Missense	173 G(1), A(0)	N/A	44 G(1), A(0)	43 G(1), A(0)	56 G(1), A(0)	108 G(0.99), A(0.01)
rs11544669	C/G	Leu/Leu	Synonymous	173 G(1), C(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs769223	A/G	AIAAla	Synonymous	173 G(1), A(0)	N/A	44 G(1), A(0)	43 G(1), A(0)	56 G(1), A(0)	55 G(1), A(0)
<b>rs4818</b>	<b>G/C</b>	<b>Leu/Leu</b>	<b>Synonymous</b>	<b>173</b> <b>C(0.673), G(0.327)</b>	<b>64</b> <b>C(0.64), G(0.36)</b>	<b>45</b> <b>C(0.61), G(0.39)</b>	<b>44</b> <b>C(0.58), G(0.42)</b>	<b>58</b> <b>C(0.59), G(0.41)</b>	<b>59</b> <b>C(0.84), G(0.16)</b>
rs4986871	T/C	Ala/Val	Missense	173 C(1), T(0)	N/A	44 C(1), T(0)	43 C(1), T(0)	N/A	54 C(1), T(0)
rs8192488	T/C	AIAAla	Synonymous	173 C(1), T(0)	N/A	81 C(0.99), T(0.01)	N/A	109 C(0.99), T(0.01)	104 C(0.93), T(0.07)
<b>rs4680</b>	<b>A/G</b>	<b>Val/Met</b>	<b>Missense</b>	<b>173</b> <b>G(0.676), A(0.324)</b>	<b>64</b> <b>G(0.78), A(0.22)</b>	<b>82</b> <b>G(0.70), A(0.30)</b>	<b>82</b> <b>G(0.73), A(0.27)</b>	<b>110</b> <b>G(0.51),A(0.49)</b>	<b>108</b> <b>G(0.69), A(0.31)</b>



รูปที่ 45 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่ง rs4818 (c.408C>G หรือ p. L136L) และ rs4680 (c.472G>A หรือ p. V158M) นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอใน COMT เอกซอน 4 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อเล็กโตรโแกรมตามลำดับ ในผู้ป่วยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม ลูกศรแสดงตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม

### การตรวจกรองการกลายพันธุ์เอกซอน 5 บนยีน *COMT*

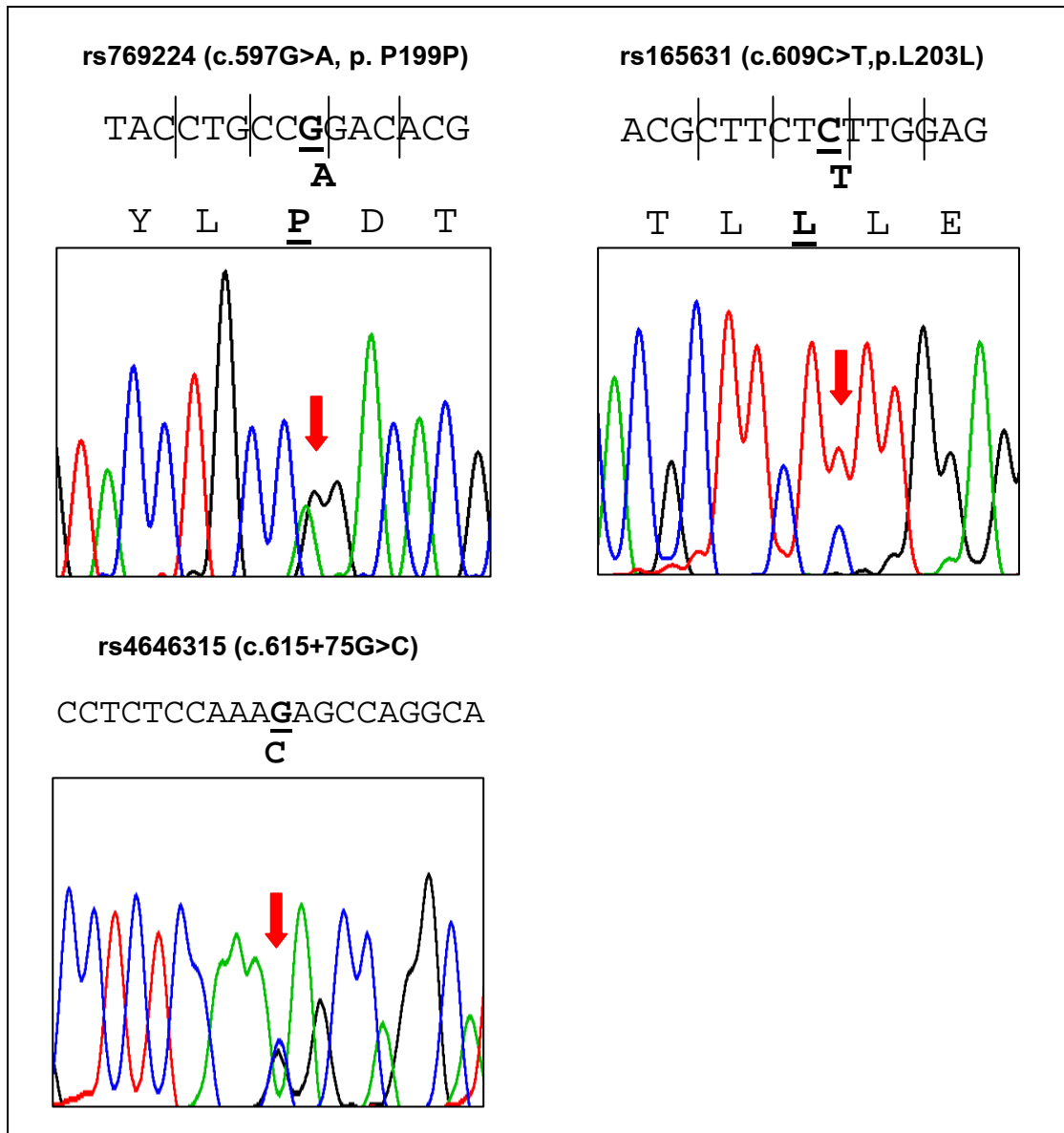
การตรวจกรองความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* บริเวณ เอกซอน 5 สามารถตรวจดูลำดับเบสได้บริเวณเอกซอน 5 และอินทรอน 5 บางส่วน พบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ 3 แบบ ซึ่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมและเคยมีรายงานแล้ว ตำแหน่ง rs769224 (c.597G>A หรือ p.P199P) และ rs165631 (c.609C>T หรือ p.L203L) บริเวณเอกซอน 5 และตำแหน่ง rs4646315 (c.615+75G>C) บริเวณอินทรอน 5 ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นๆ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม (รูปที่ 46 และ 47 และตารางที่ 14



รูปที่ 46 แสดงแผนที่สนิปส์จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ที่พบบริเวณเอกซอน 5 บนยีน *COMT* จาก Accession number: NT\_011519.10 และ NM\_000754.3 (สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553)

ตารางที่ 14 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* ในเอกซอน 5 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับความถี่แอลลีลจากกลุ่มประชากรอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553 (จำนวนผู้ป่วย 173 ราย)

SNPs ID	แอลลีล	บริเวณ	กรดอะมิโน เปลี่ยน	เปลี่ยนแปลง แบบ	ความถี่แอลลีล					
					เด็กไทยออทิซึม	ไทย	จีน	ญี่ปุ่น	ยุโรป	แอฟริกัน ซับ-ซาสาร่า
rs79048885	A/G	เอกซอน 5	Gln170Gln	Synonymous	173 G(1), A(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13306279	T/C	เอกซอน 5	Pro199Leu	Missense	173 C(1), T(0)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>rs769224</b>	<b>A/G</b>	<b>เอกซอน 5</b>	<b>Pro199Pro</b>	<b>Synonymous</b>	<b>173</b> <b>G(0.939), A(0.061)</b>	<b>N/A</b>	<b>82</b> <b>G(0.90), A(0.10)</b>	<b>82</b> <b>G(0.98), A(0.02)</b>	<b>111</b> <b>G(0.99), A(0.01)</b>	<b>108</b> <b>G(0.88), A(0.12)</b>
rs165631	T/C	เอกซอน 5	Leu203Leu	Synonymous	173 C(0.997), T(0.003)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646315	C/G	อินทรอน 5	-	-	173 G(0.861), C(0.139)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

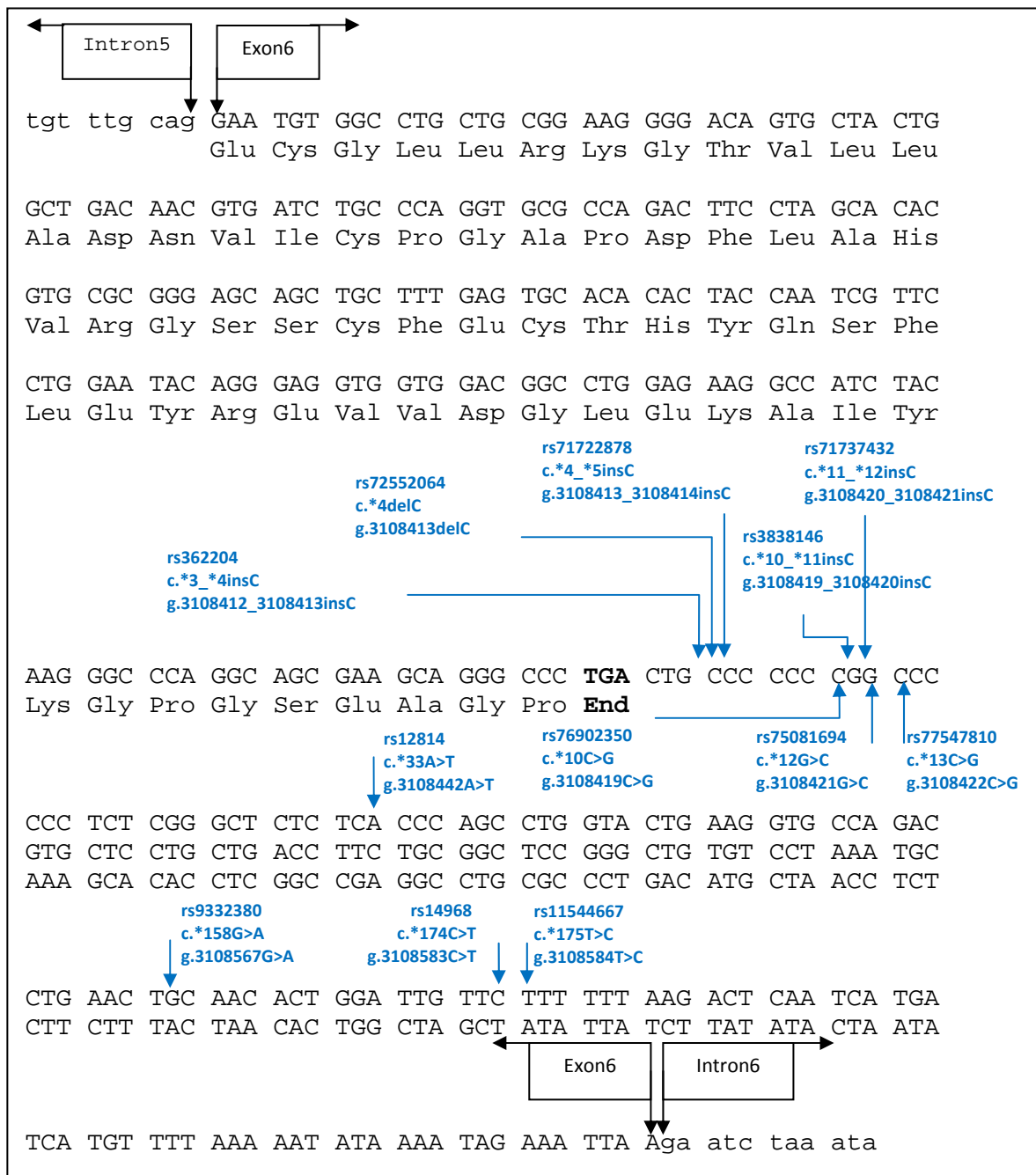


รูปที่ 47 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่ง rs769224 (c.597G>A หรือ p.P199P) ตำแหน่ง rs165631 (c.609C>T หรือ p.L203L) และตำแหน่ง rs4646315 (c.615+75G>C) นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอยีน *COMT* ของเอกซอน 5 และอินทรอน 5 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อิเล็กโตรโกราฟีตามลำดับ ในผู้ป่วยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม ลูกศรแสดงตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม



### การตรวจกรองการกลายพันธุ์เอกซอน 6 บนยีน *COMT*

จากการตรวจกรองความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 6 สามารถตรวจดูลำดับเบสพบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอโดยมีการเพิ่มขึ้นมา (Insertion) การขาดหายไป (deletion) ของเบส C หลังตำแหน่งหยุดแปลรหัสเป็นโปรตีน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าการเพิ่มขึ้นมาหรือขาดหายไปของเบส C เป็นตำแหน่งสปีดิตตามฐานข้อมูล จึงกำหนดให้การพบการเพิ่มขึ้นมาหรือขาดหายไปของเบส C เป็นลักษณะ Indel C ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นๆ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม (รูปที่ 48 และ 49 และตารางที่ 15)

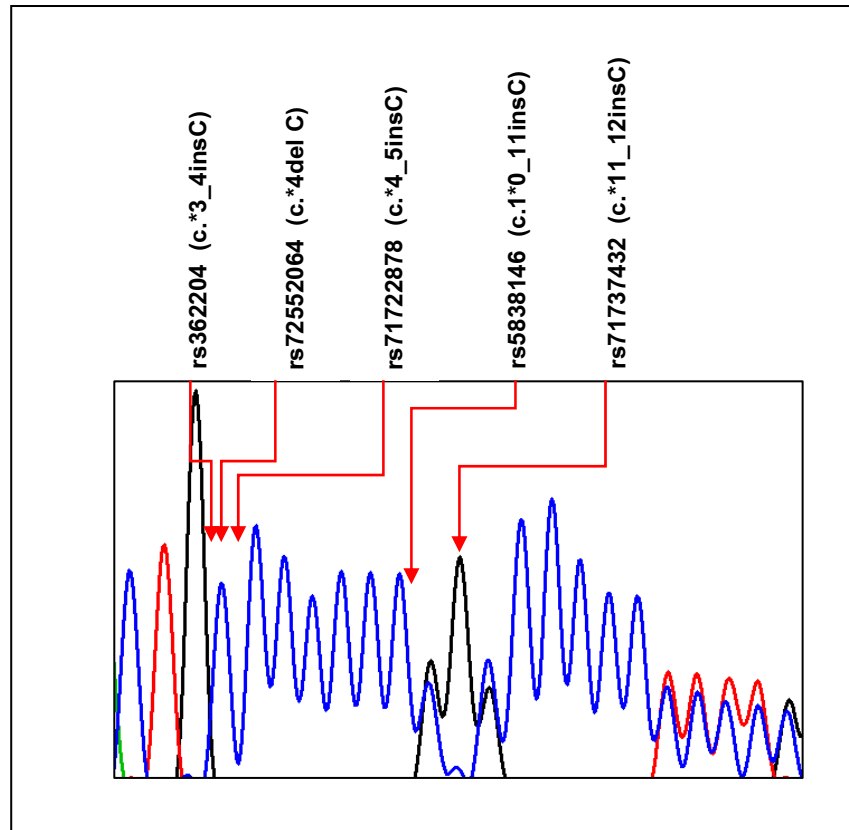


รูปที่ 48 แสดงแผนที่สไนป์สจากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap บริเวณเอกซอน 6 บนยีน COMT จาก Accession number: NT\_011519.10 และ NM\_000754.3 (สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553) บริเวณที่มีการแทรกเพิ่มหรือขาดหายไปของลำดับเบสไซโทซีน (C) สามารถเขียนได้อีกแบบเป็น\*3\_\*12IndelC

ตารางที่ 15 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *COMT* ในเอกซอน 6 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับความถี่แอลลีลจากกลุ่มประชากรอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553 (จำนวนผู้ป่วย 173 ราย)

SNPs ID	แอลลีล	ความถี่แอลลีล					
		ไทย	จีน	ญี่ปุ่น	ยุโรป	แอฟริกัน ชับ-ซาสาร่า	เด็กไทยออทิซึม
rs362204*	insC/-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	173 No Indel C (0.422), Indel C (0.578)
rs72552064*	delC/-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs71722878*	insC/-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs3838146*	insC/-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs71737432*	insC/-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs76902350	G/C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	173 C(1), G(0)
rs75081694	C/G	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	173 G(1), C(0)
rs77547810	G/C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	173 C(1), G (0)
rs12814	T/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	173 A(1), T(0)
rs9332380	A/G	N/A	42 G:1, A(0)	42 G:1, A(0)	55 G:1, A(0)	108 G(0.94), A(0.06)	173 G(1), A(0)
rs14968	T/C	N/A	N/A	N/A	C(1), T(0)	N/A	173 C(1), T(0)
11544667	T/C	N/A	N/A	N/A	T(1), C(0)	N/A	173 T(1), C(0)

หมายเหตุ กำหนดแอลลีลที่ตำแหน่งสลิปส์ \* ในกลุ่มเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมบริเวณตำแหน่ง c.\*3\_12IndelC สามารถเขียนความถี่ได้แบบ Indel C/No Indel C โดย No Indel C จะมีลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันฐานข้อมูล (Common reference sequence)



รูปที่ 49 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 5'-3' บริเวณตำแหน่งสปีส์ที่พบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอโดยมีการเพิ่มขึ้นมา (Insertion) การขาดหายไป (Deletion) ของเบส C หลังตำแหน่งหยุดแปลรหัสเป็นโปรตีน ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าการเพิ่มขึ้นมาหรือขาดหายไปของเบส C เป็นตำแหน่งสปีส์ใดตามฐานข้อมูล จึงกำหนดให้การพบการเพิ่มขึ้นมาหรือขาดหายไปของเบส C เป็นลักษณะ Indel C จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ อิเล็กโตรเฟอโรแกรมในผู้ป่วยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม ลูกศรแสดงตำแหน่งสปีส์

### การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบบนยีน *COMT*

การกลายพันธุ์ (Mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงระดับยีน เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการจัดเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอที่มีลักษณะใหม่ต่างจากเดิม ส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพการทำงาน หรือมีการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่มากกว่าปกติหรือทำหน้าที่ใหม่ที่ผิดปกติออกมาแทน ดังนั้นการตรวจสอบหรือพิสูจน์ว่าตำแหน่งดังกล่าวมีการกลายพันธุ์หรือไม่ จึงควรพิจารณาถึง การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน การถ่ายทอดในครอบครัว การเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นว่าเป็นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งอนุรักษ์ การทดสอบในกลุ่มประชากรปกติ

การศึกษาพบการเปลี่ยนแปลง (Variant) ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *COMT* จึงต้องทำการพิสูจน์ตามที่กล่าวมาข้างต้น โดยพบการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 4 แบบในผู้ป่วย 4 ราย คือ แบบ c.-130C>T, c.-91+1G>A, c.106A>G (p.I36V) และ c.268A>G (p.M90V) (ตารางที่ 16)

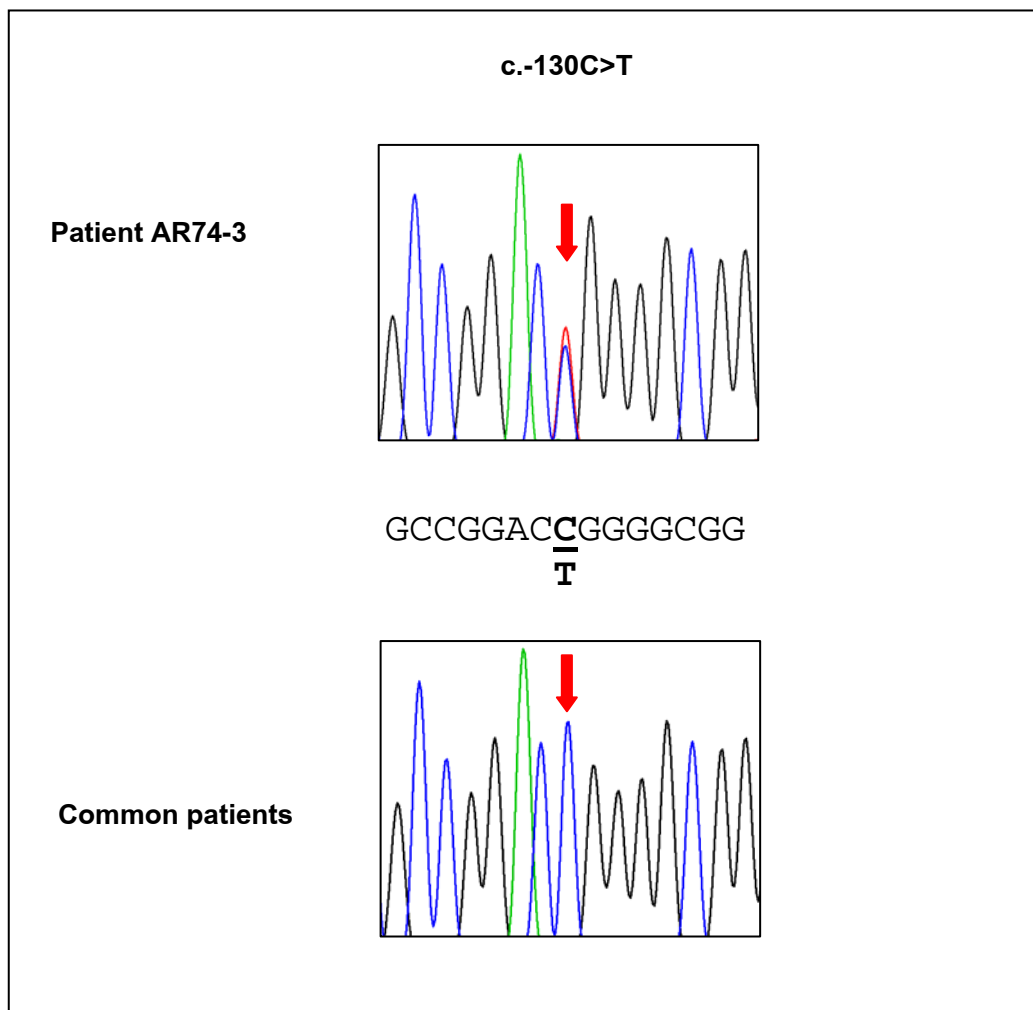
ตารางที่ 16 แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบบนยีน *COMT* ในเด็กไทยที่เป็น ออทิสซึมสเปกตรัม (4 ราย)

ผู้ป่วย	ชนิดการเปลี่ยนแปลง	การเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอ	การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน	บริเวณ
AR74-3	-	c.-130C>T	-	เอกซอน 1
AR78-3	-	c.-91+1G>A	-	อินทรอน 1
AR29-3	Missense	c.106A>G	p.I36V	เอกซอน 3
TM37-3	Missense	c.268A>G	p.M90V	เอกซอน 3

### อิเล็กโทรโพรแกรมการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

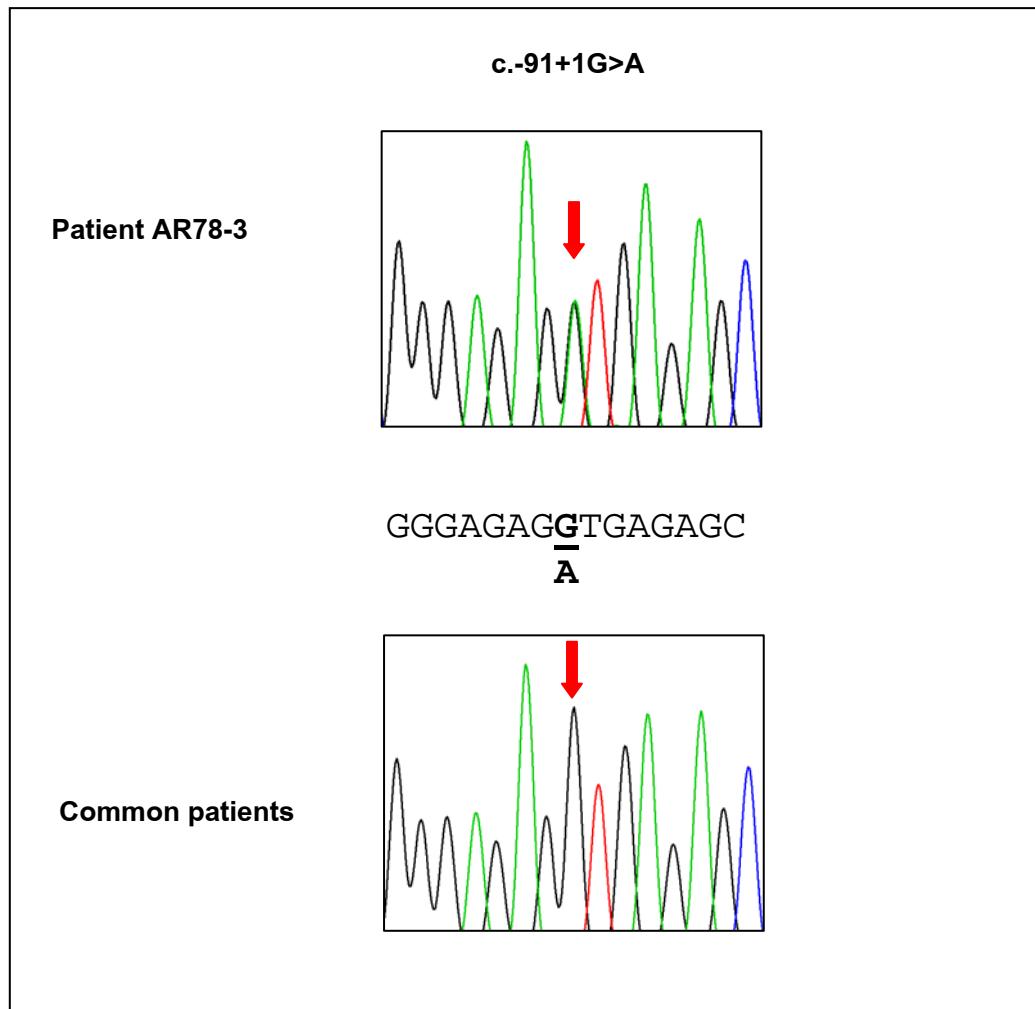
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COMT* ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึมที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ แสดงดังอิเล็กโทรโพรแกรมต่อไปนี้

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COMT* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแบบ PDD-NOS (AR74-3) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-130C>T (รูปที่ 50)



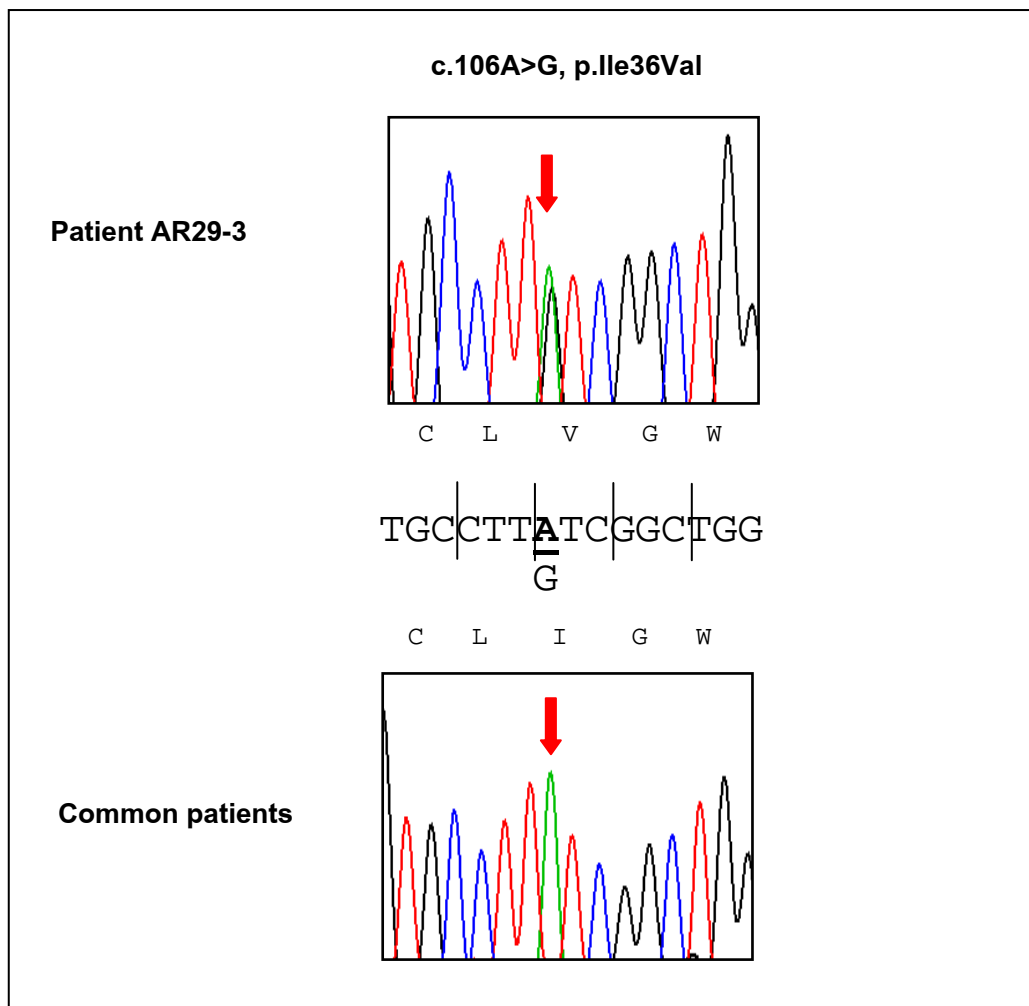
รูปที่ 50 แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง c.-130C>T โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อิเล็กโทรโพรแกรม แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ 5'-3' บนยีน *COMT* ผู้ป่วย AR74-3 (บน) เปรียบเทียบกับผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ล่าง) ลูกศรและนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการแทนที่ตำแหน่งที่ c. -130 จาก C เป็น T

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COMT* ในผู้ป่วยออทิซึม (AR78-3) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-91+1G>A (รูปที่ 51)



รูปที่ 51 แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง c.-91+1G>A โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อิเล็กโทรเฟอโรแกรม แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ 5'-3' บนยีน *COMT* ผู้ป่วย AR78-3 (บน) เปรียบเทียบกับผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ล่าง) ลูกศรและนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการแทนที่ตำแหน่ง c.-91+1 จาก G เป็น A

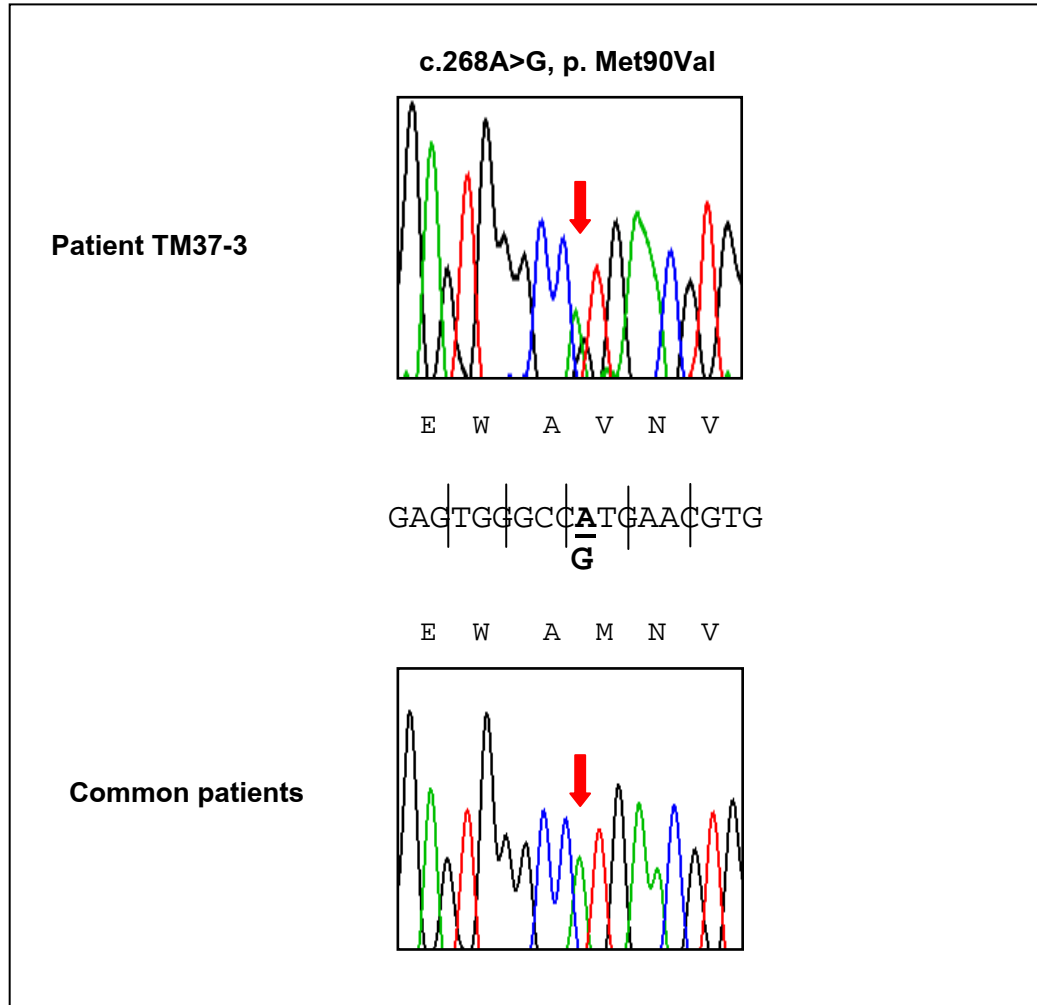
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COMT* ในผู้ป่วยออทิซึม (AR29-3) ซึ่งมี การเปลี่ยนแปลงแบบ c.106A>G (p.I36V) (รูปที่ 52)



รูปที่ 52 แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง p.I36V โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ อิเล็กโตรเฟอโรแกรม แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ 5'-3' บนยีน *COMT* ผู้ป่วย AR29-3 (บน) เปรียบเทียบกับผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ล่าง) ลูกศรและนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือ นิวคลีโอไทด์ที่เกิดการแทนที่ตำแหน่ง 106 จาก A เป็น G ทำให้กรดอะมิโนบนสายโปรตีน MB-COMT ตำแหน่ง 36 เปลี่ยนจาก I (Isoleucine) เป็น V (Valine)



การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COMT* ในผู้ป่วยออกิซิม (TM37-3) ซึ่งมี การเปลี่ยนแปลงแบบ c.268A>G (p.M90V) (รูปที่ 53)



**รูปที่ 53** แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง p. M90V โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ อิเล็กโตรเฟอโรแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ 5'-3' บนยีน *COMT* ผู้ป่วย TM37-3 (บน) เปรียบเทียบกับผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ล่าง) ลูกศรและนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้คือนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการแทนที่ตำแหน่ง 268 จาก A เป็น G ทำให้กรดอะมิโนบนสายโปรตีน MB-COMT ตำแหน่ง 90 เปลี่ยนแปลงจาก M (Methionie) เป็น V (Valine)

### การยืนยันการกลายพันธุ์และ/หรือความหลากหลายทางพันธุกรรม

การพิจารณาการกลายพันธุ์ของยีนจะพิจารณาจากเงื่อนไขของการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอหรือโปรตีน โดยทั่วไปจะพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้มีการเปลี่ยนไปของกรดอะมิโน การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่อนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด รวมถึงการพิจารณาการถ่ายทอดในครอบครัวซึ่งทำให้ทราบถึงต้นกำเนิดของการเปลี่ยนแปลงนั้น ดังนั้นในผู้ป่วยที่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นการกลายพันธุ์ทั้งแบบที่เคยรายงานแล้วและการกลายพันธุ์แบบใหม่หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบใหม่จะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในครอบครัว

### การถ่ายทอดในครอบครัว

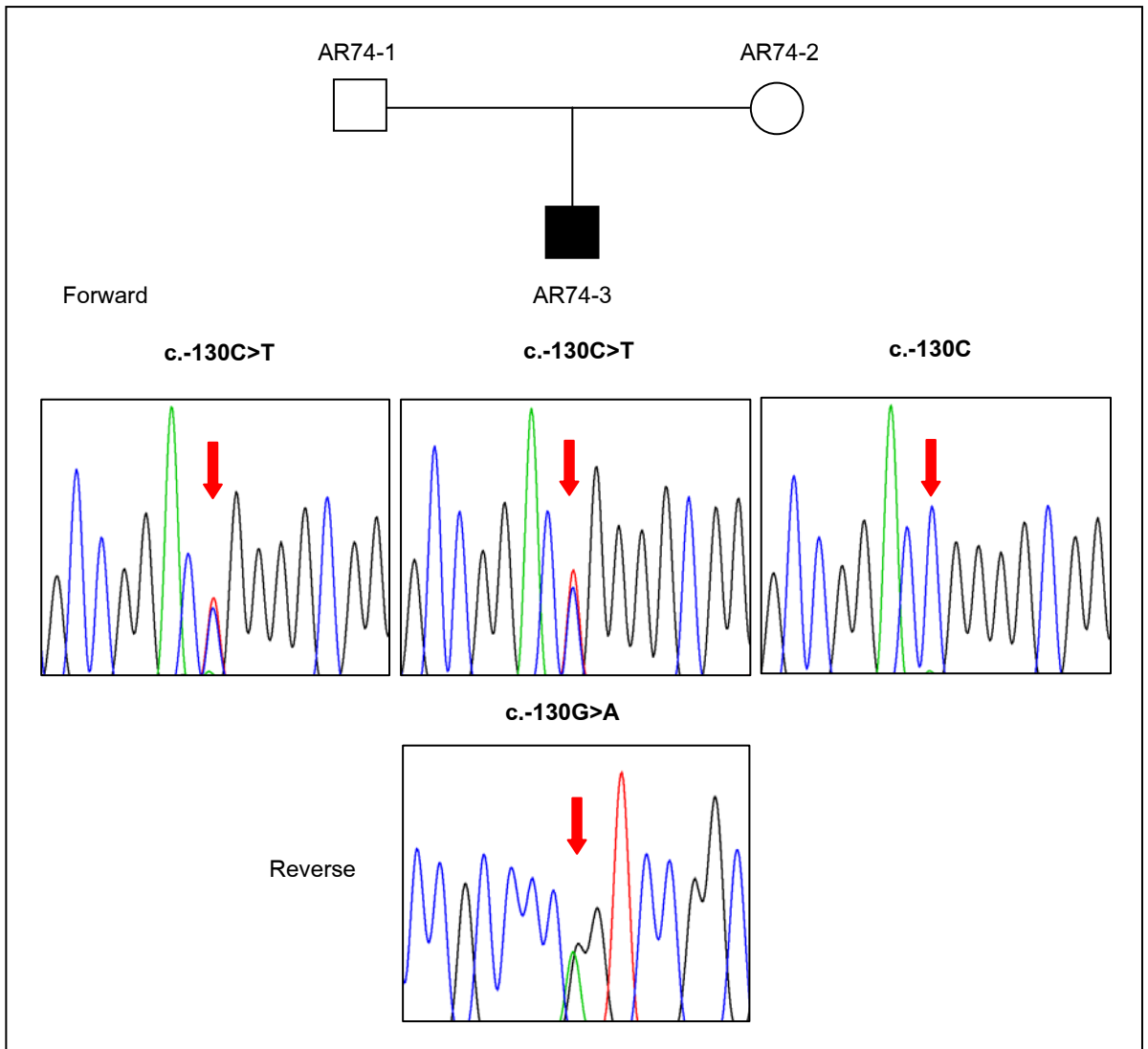
การศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากมารดาและบิดา (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับการถ่ายทอดในบิดาและมารดา ผู้ป่วยโดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์/ การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน	การทดสอบในบิดา	การทดสอบในมารดา
c.-130C>T	c.-130C>T	c.-130C
c.-91+1G>A	c.-91+1G>A	c.-91+1G
c.106A>G (p.I36V)	ไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเอ	c.106A>G
c.268A>G (p.M90V)	c.268A	c.268A>G

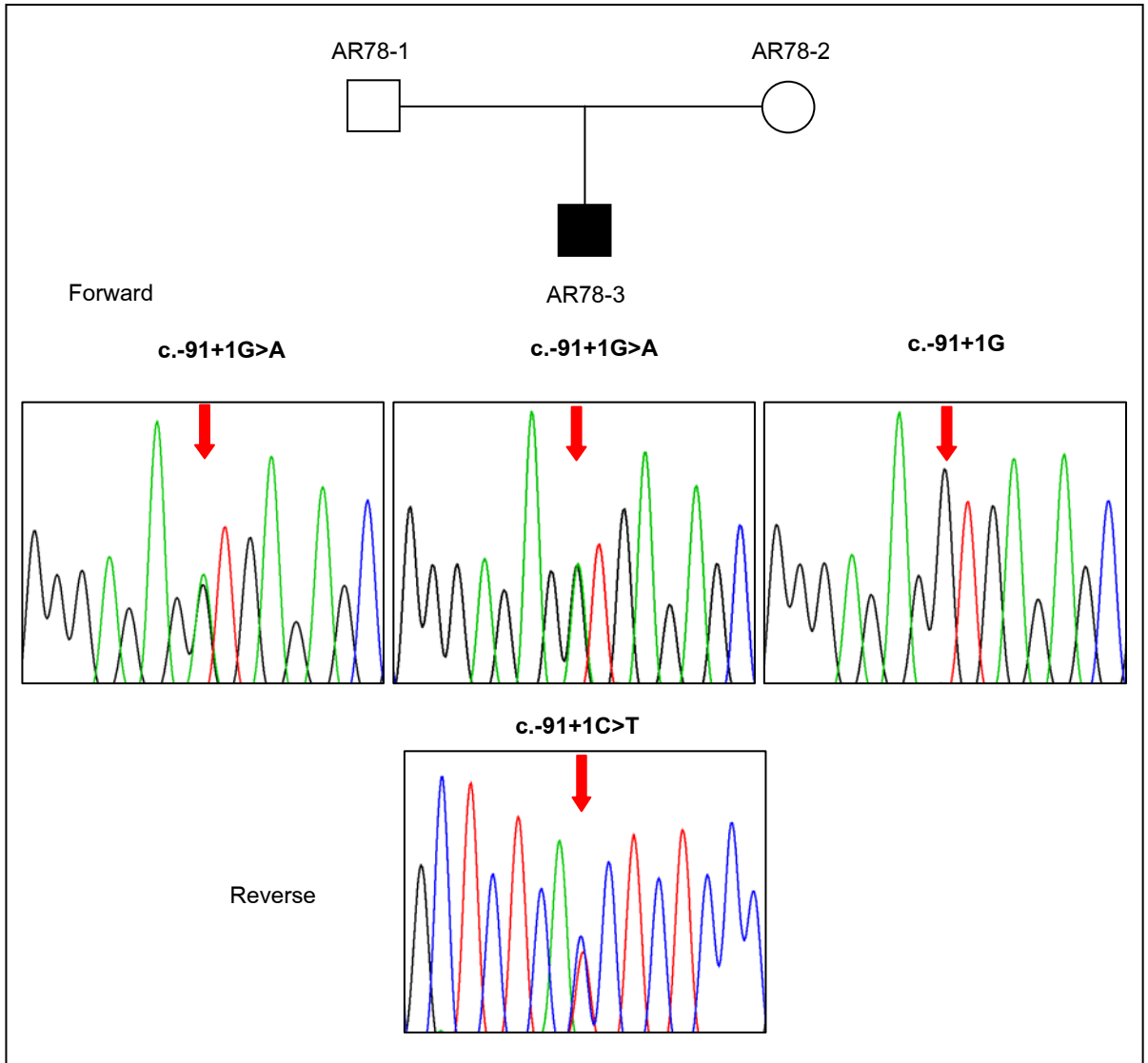
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อดูการถ่ายทอดในครอบครัวในผู้ป่วยที่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นการกลายพันธุ์แบบใหม่หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบใหม่ แสดงดังรูปต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อดูการถ่ายทอดในครอบครัว AR74 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-130C>T (รูปที่ 54)



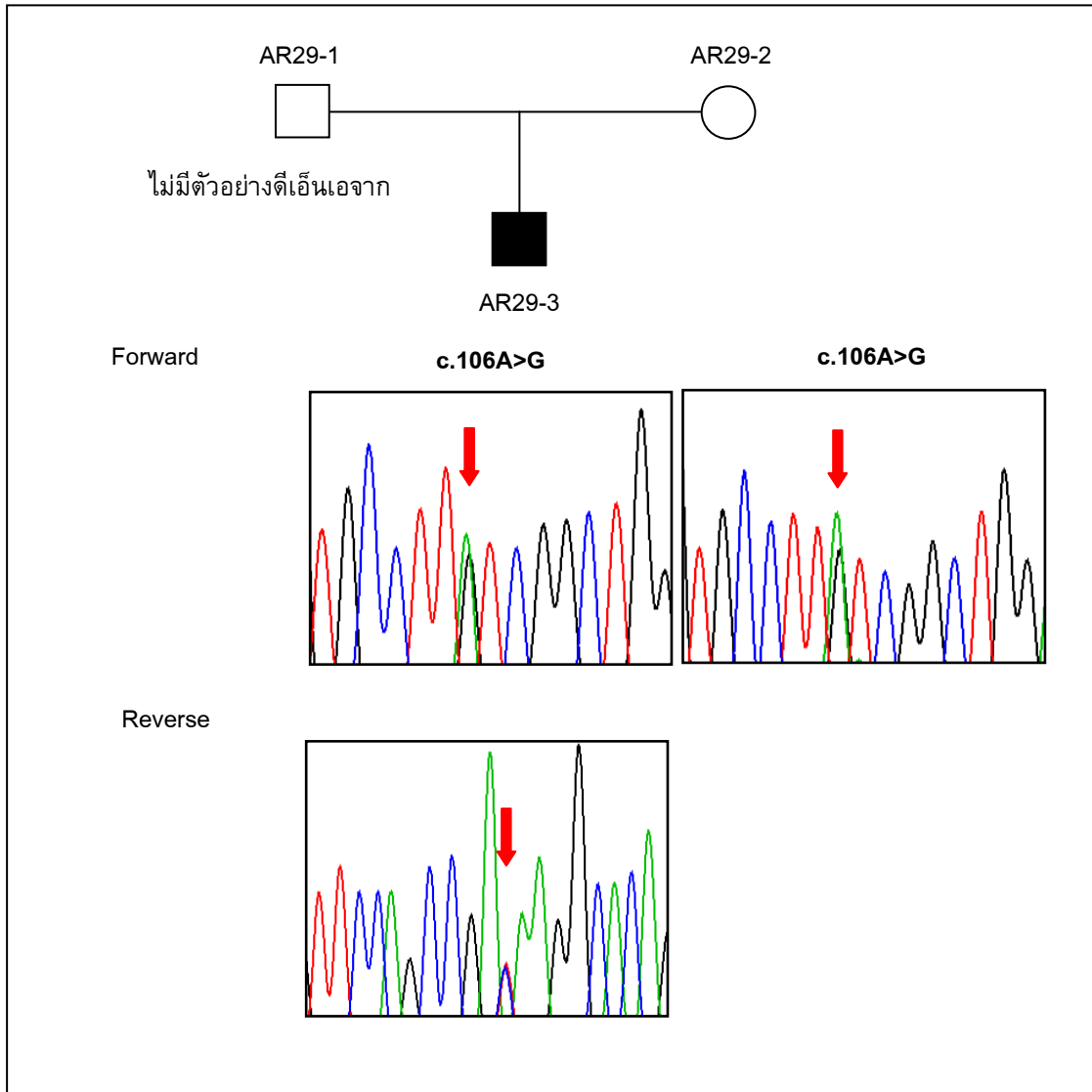
**รูปที่ 54** แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-130C>T ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแบบ PDD-NOS (AR74-3) ลูกศรสีแดงแสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง c.-130C>T จากอเล็กโทรเฟอโรแกรมบางส่วน ผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดแอลลีล T มาจากบิดา (AR74-1)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อดูการถ่ายทอดในครอบครัว AR78 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-91+1G>A (รูปที่ 55)



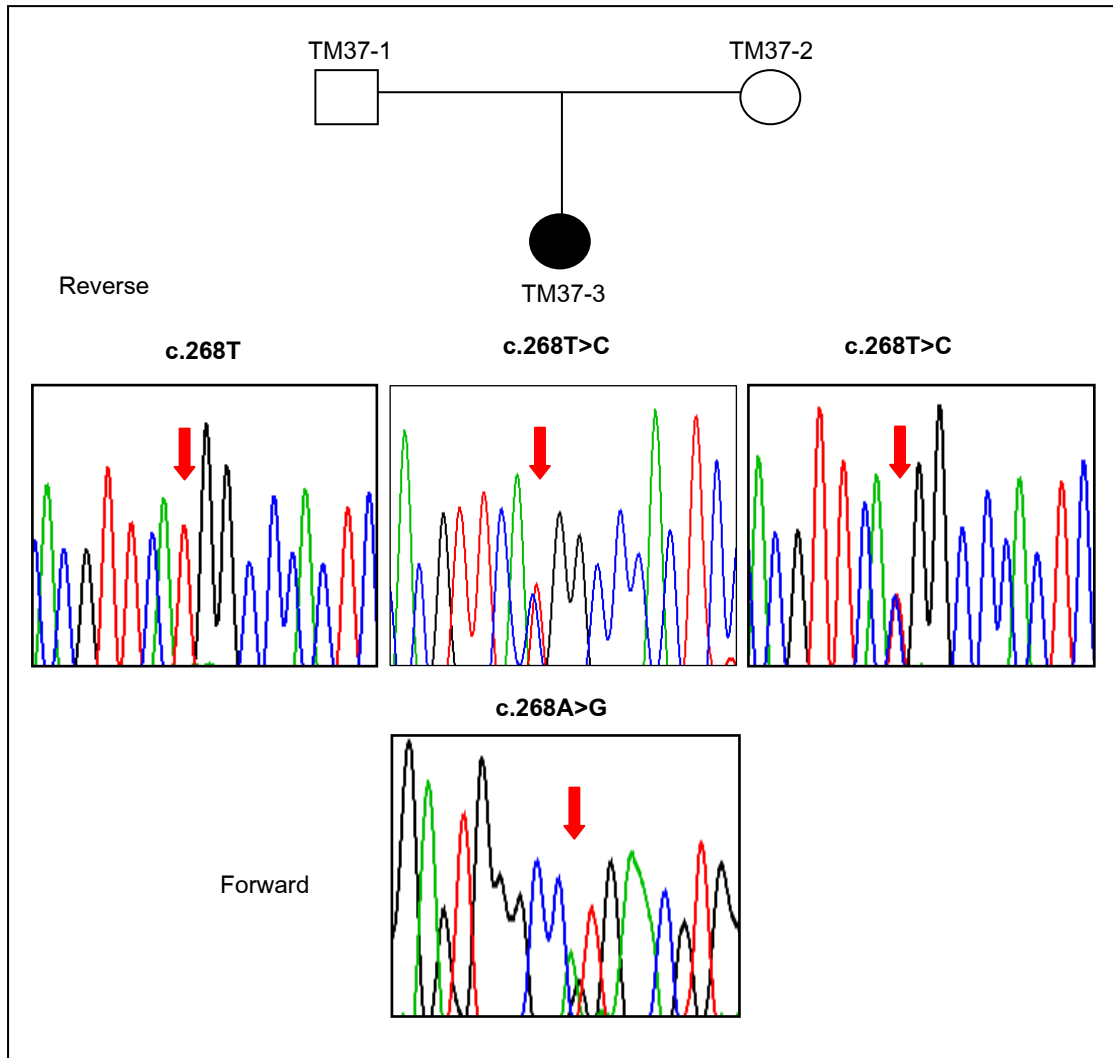
รูปที่ 55 แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-91+1G>A ในผู้ป่วย ออทิสซึม (AR78-3) ลูกศรสีแดงแสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง c.-91+1G>A จากอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมบางส่วน ผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดแอลลีล A มาจากบิดา (AR78-1)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อดูการถ่ายทอดในครอบครัว AR29 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.106A>G (p.I36V) (รูปที่ 56)



รูปที่ 56 แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.106A>G (p.I36V) ในผู้ป่วยออทิซึม (AR29-3) ลูกศรสีแดงแสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง c.106A>G จากอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมบางส่วน ผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดแอลลีล G มาจากมารดา (AR29-2) ไม่มีดีเอ็นเอจากบิดาจึงไม่มีผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนทำให้ได้กรดอะมิโนต่างไปจากเดิม p.I36V

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อดูการถ่ายทอดในครอบครัว TM37 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.268A>G (p.M90V) (รูปที่ 57)



รูปที่ 57 แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.268A>G (p.M90V) ในผู้ป่วยออทิซึม (TM37-3) ลูกครีแสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง c.268T>C (reverse) จากอิเล็กโทรเฟอโรแกรมบางส่วนผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดแอลลีล C มาจากมารดา (TM37-2) การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนทำให้ได้กรดอะมิโนต่างจากไปเดิม p. M90V

### การเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นการกลายพันธุ์แบบใหม่หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบใหม่มีการเปรียบเทียบตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ แสดงดังรูปต่อไปนี้

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นตำแหน่งที่การเปลี่ยนแปลงแบบ p.I36V (รูปที่ 58)

		30	↓	40	
Homo sapiens	20	VVLLLLLRHWGWLCL	I	IGWNEFILQPIHNLL	50
Pan troglodytes		VVLLLLLRHWGWLCL	I	IGWNEFVLQPIHNLL	
Mus musculus		LAFLLLLRHLGWGLVA	I	IGWFEFVQQPVHNLL	
Rattus norvegicus		LALLLLLLRHLGWGLVT	I	IFWFEYVLQPVHNLI	
Danio rerio		ASVLVLLRQS-SGLLAL	L	LLWHDVVHQRLLNFF	
Xenopus laevis		-----		-----	
Mycobacterium avium		KRRIPLLRWSVWRMAAG	G	-----VQNITTTGQ	
Aspergillus fumigatus		----MAALATNTSIS	S	QGFYKPEENVFCNDG	
Schizosaccharomyces pombe		QALHWLTTSKLRYALAL	L	PFLFFILYTKTKKS	

**รูปที่ 58** แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นตำแหน่ง p.I36V พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 36 เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ ลิงชิมแปนซี หนูหริ่ง หนูขาว แต่ไม่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตที่ต่ำกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นตำแหน่งที่การเปลี่ยนแปลงแบบ p. M90V (รูปที่ 59)

		↓	95	105	
Homo sapiens	88	W			115
Pan troglodytes		W			
Mus musculus		W			
Rattus norvegicus		W			
Danio rerio		W			
Xenopus laevis		W			
Mycobacterium avium		M			
Aspergillus fumigatus		F			
Schizosaccharomyces pombe		F			

**รูปที่ 59** แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่นตำแหน่ง p.M90V พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 90 พบในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้แก่ ลิงชิมแปนซี หนูหริ่ง หนูขาว และสิ่งมีชีวิตที่ต่ำกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ เชื้อราและยีสต์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิต

### การทดสอบในประชากรปกติ

การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นการกลายพันธุ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบใหม่มีการเปรียบเทียบตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกับกลุ่มประชากรปกติจำนวน 115 ราย (230 แอลลีล) โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าประชากรทุกรายไม่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-130C>T, c.-91+1G>A, c.106A>G (p.I36V) และ c.268A>G (p.M90V) (ตารางที่ 18)

**ตารางที่ 18** แสดงจำนวนประชากรที่ใช้ทดสอบการกลายพันธุ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบใหม่

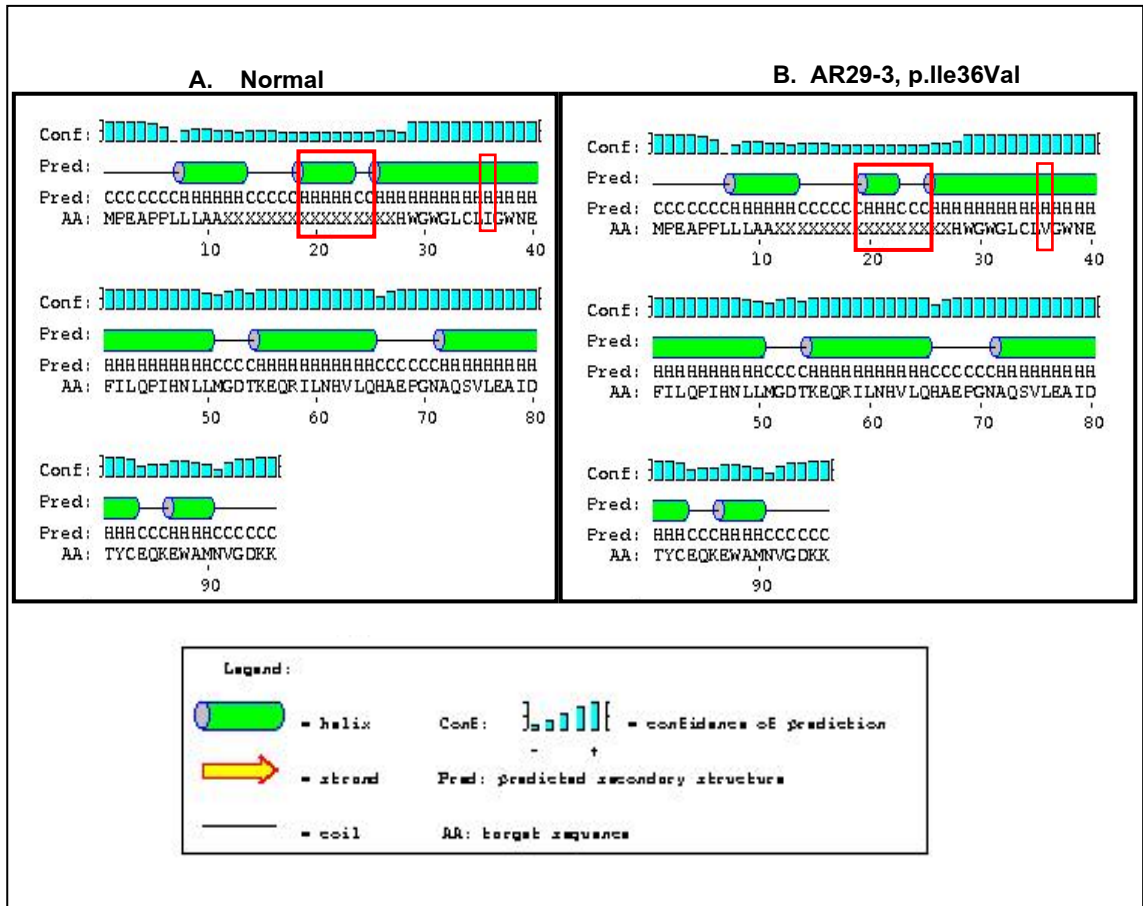
กลุ่มประชากร	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (แอลลีล)			
	c.-130C	c.-91+1G	c.106A (p.I36I)	c.268A (p.M90M)
เพศชาย	176	176	176	176
เพศหญิง	54	54	54	54
รวม	230*	230*	230*	230*

หมายเหตุ \*ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ทุกราย



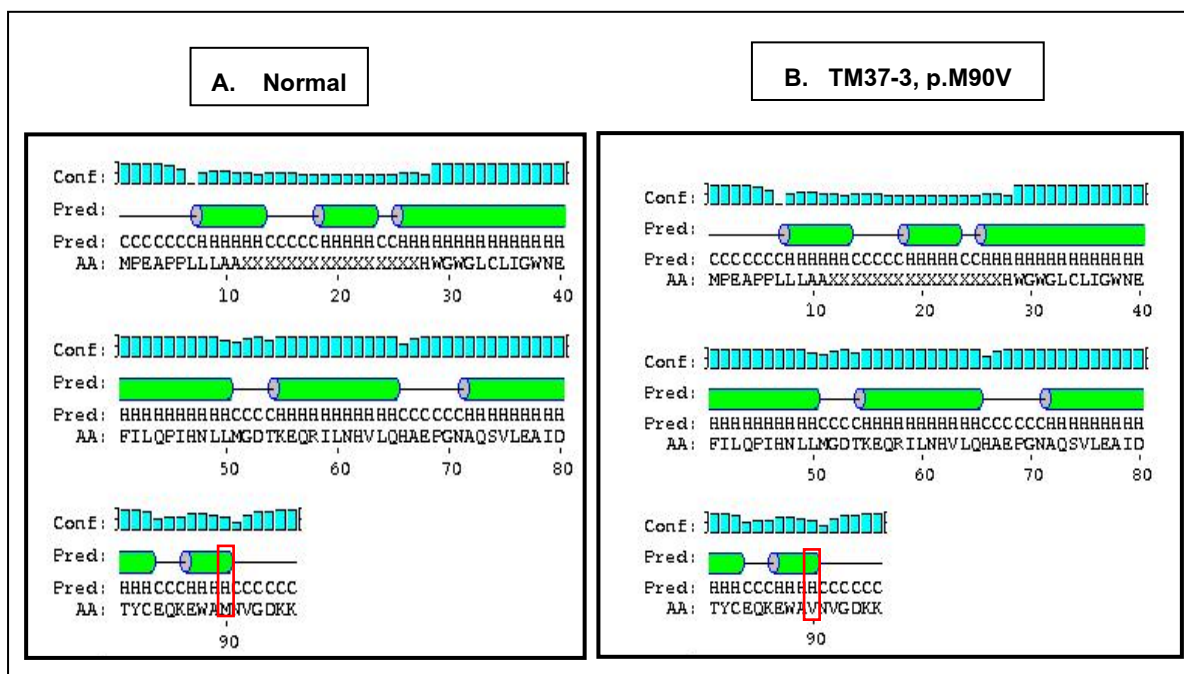
### การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน

การเปรียบเทียบโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนในคนปกติกับตำแหน่งที่การเปลี่ยนแปลงแบบ p.I36V (รูปที่ 60)



รูปที่ 60 แสดงผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT บริเวณเอกซอน 3 (A) แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT ในคนปกติ (B) แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT ในผู้ป่วย AR29-3 พบลำดับกรดอะมิโนของคนปกติที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 19 – 25 มีโครงสร้างแบบ Helix จำนวน 5 ตำแหน่ง ตามด้วยโครงสร้างแบบ Coil จำนวน 2 ตำแหน่งและต่อด้วยโครงสร้างแบบ Helix อีก 10 ตำแหน่ง ตามลำดับก่อนถึงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 36 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนไอโซลิวซีน แต่โครงสร้างทุติยภูมิในผู้ป่วย AR29-3 ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 19 - 25 มีโครงสร้างแบบ coil จำนวน 1 ตำแหน่ง โครงสร้างแบบ Helix จำนวน 3 ตำแหน่ง โครงสร้างแบบ coil จำนวน 3 ตำแหน่ง และต่อด้วยโครงสร้างแบบ Helix อีก 10 ตำแหน่ง ตามลำดับก่อนถึงกรดอะมิโนตำแหน่ง 36 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนวาเลีน แสดงให้เห็นว่าโปรตีน MB-COMT ของผู้ป่วยมีโครงสร้างแบบ Helix ที่สั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ

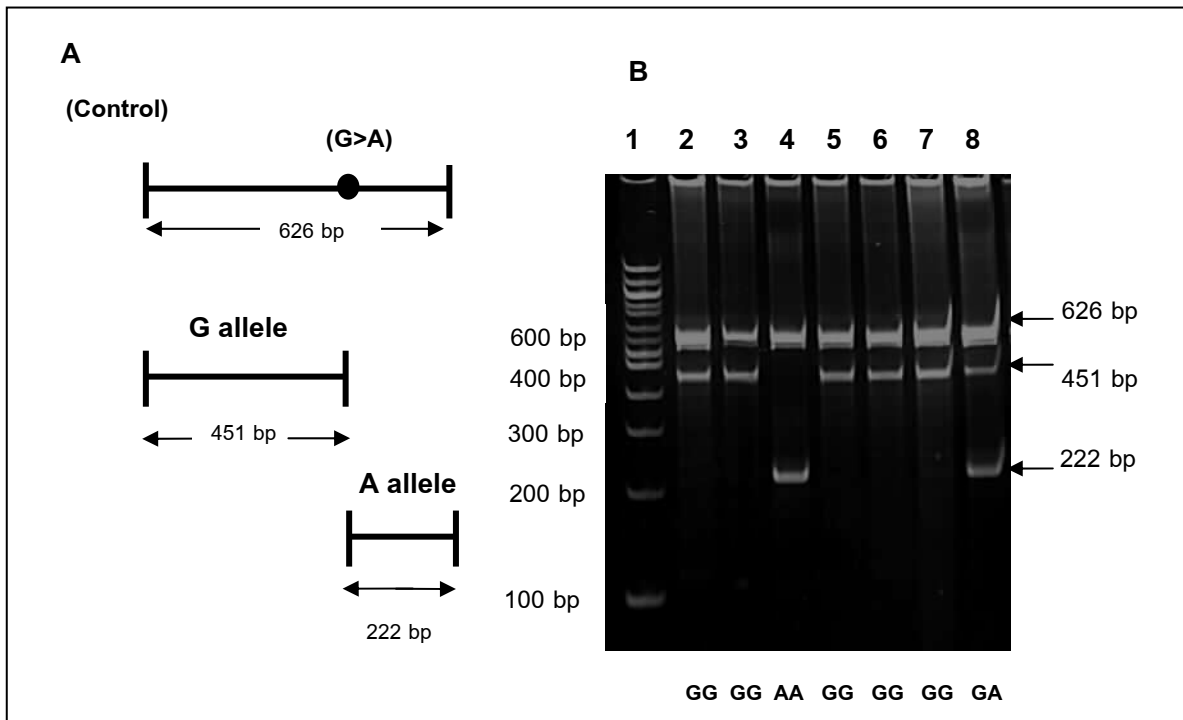
การเปรียบเทียบโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนในคนปกติกับตำแหน่งที่การเปลี่ยนแปลงแบบ p.M90V (รูปที่ 61)



รูปที่ 61 แสดงผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT บริเวณเอกซอน 3 (A) แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT ในคนปกติ (B) แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT ในผู้ป่วย TM37-3 ไม่พบความแตกต่างจากการทำนายลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน MB-COMT ในผู้ป่วยเทียบกับคนปกติจากบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเมทไทโอนีนเป็นกรดอะมิโนวาเลีนที่ตำแหน่งโคดอน 90 ของกรดอะมิโน

## การศึกษาของสปีส์บีนีน *COMT*

การศึกษาสปีส์บีนีน *COMT* ศึกษาจีโนไทป์จากบิดามารดาและกลุ่มควบคุม ด้วยวิธีไบแอลลีลิกอาร์ม (Allele specific PCR) ในตำแหน่ง rs4680 ซึ่งเป็น Functional polymorphism (รูปที่ 62) เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสปีส์ตำแหน่งดังกล่าว



รูปที่ 62 แสดงผลเจลอะครีลาไมด์โดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มของตำแหน่ง c.472G>A, p.V158M (rs4680) A. แสดงไดอะแกรมไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ที่ขนาดต่างๆ B. แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ แถว 1 เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว 2-8 เป็นตัวอย่างที่ศึกษา การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Internal control มีขนาด 626 คู่เบส แถว 2 3 5 6 7 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส GG แถว 4 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส AA แถว 8 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส GA ตามลำดับ

## ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ลักษณะทางคลินิกในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม การศึกษานี้เป็นการศึกษาทางพันธุศาสตร์จึงต้องการผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติที่ชัดเจน จัดอยู่ในกลุ่ม Idiopathic autism ต้องผ่านการตรวจกรองไม่มีความผิดปกติของโครโมโซม ความผิดปกติของการผ่าเหล่าของยีนเออาร์เอกซ์ กลุ่มอาการเรตต์ กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ ไม่มีปัญหาการคลอด ปัญหาสุขภาพในช่วงปริกำเนิด น้ำหนักแรกคลอดไม่ต่ำกว่า 2,000 กรัม และไม่เป็นการคลอดก่อนกำหนด

ดังนั้นจำนวนผู้ป่วยที่นำมาวิเคราะห์ทางอณูชีวโมเลกุล จึงมีผู้ป่วยสำหรับเข้าเกณฑ์ในการนำมาศึกษา 188 ราย เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิตินั้นได้ใช้โปรแกรม PLINK (Purcell et al., 2007) และโปรแกรมแฮพลอวิว (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) ทำการศึกษาและจากการเก็บรวบรวมข้อมูลลักษณะทางคลินิกของเด็กไทยที่เป็น ออทิซึมสเปคตรัมในรูปแบบต่างๆ เช่น การเก็บประวัติครอบครัว การวินิจฉัยโรคตามเกณฑ์ DSM-IV จะใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์แบบแยกประเภทเพิ่มเติมได้ เพื่อให้เข้าถึงสาเหตุหรือความสัมพันธ์ที่อาจจะนำไปสู่การเกิดโรคมมากขึ้น ดังนี้

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	
	Population-based case control	Family-based study
ผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด	188	160
ผู้ป่วยทั้งหมดเพศชาย	156	134
ผู้ป่วยออทิซึมครบตามเกณฑ์จากการวินิจฉัยตาม DSM-IV	146	125

### คำอธิบายสัญลักษณ์

NS (Non Significance)	ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
*** (Significance)	พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
df (degree of freedom)	ระดับชั้นแห่งความอิสระ
P-value (Probability value)	ค่าความน่าจะเป็น
$\chi^2$ (Chi Square)	ค่าการทดสอบไคสแควร์

OR (Odd ratio)	อัตราส่วนของโอกาสที่จะเกิดเหตุการณ์หนึ่งต่อโอกาสที่จะไม่เกิดเหตุการณ์นั้น
CI (Confidence interval)	ช่วงของความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของค่า Odd ratio จากค่าต่ำสุดถึงค่าสูงสุด

### การทดสอบสมมติฐานทางสถิติ

สมมติฐานเชิงสถิติ  $H_0$  เป็นสมมติฐานหลัก (Null hypothesis) ซึ่งไม่มีใครทราบว่าถูกหรือผิด สำหรับการสรุปผลนั้นผู้สรุปอาจปฏิเสธสิ่งที่ถูกหรือยอมรับสิ่งที่ผิด ดังนั้นความคลาดเคลื่อนจึงเกิดขึ้นได้ในกรณีที่ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นจากการปฏิเสธสิ่งที่ถูก ( $H_0$  ที่ถูกต้อง) เรียกว่า ความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 (Type I error) สัญลักษณ์ที่ใช้แทนคือ  $\alpha$  สำหรับความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากการยอมรับสิ่งที่ผิด ( $H_0$  ที่ผิด) เรียกว่า ความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 (Type II error) ใช้สัญลักษณ์  $\beta$

ในการศึกษาทางสถิติกำหนดค่า  $\alpha = 0.05$  หมายถึง ยอมให้เกิดความคลาดเคลื่อนเพียงร้อยละ 5 หรือมีความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ร้อยละ 95 ซึ่งเป็นความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 เป็นการปฏิเสธสมมติฐานหลัก

## การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Population-based case control study

### การศึกษาความสมดุลของประชากร (Hardy Weinberg equilibrium)

#### ในกลุ่มควบคุม

ผลการทดสอบฮาร์ดี-ไวเบอร์กในกลุ่มควบคุมพบว่าค่า P-value ที่ได้มีค่ามากกว่า 0.05 ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีสภาวะสมดุลของฮาร์ดี-ไวเบอร์ก จากการศึกษาในกลุ่มควบคุมจำนวน 250 ราย ที่มีภูมิลาเนา เพศ เชื้อชาติ สัมพันธ์กับผู้ป่วยออทิซึมซึ่งจะช่วยลดการเกิดผลบวกปลอมจากความไม่เป็นชั้นภูมิของประชากร (Population Stratification) จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม PLINK พบว่าสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 มีค่า P-value เท่ากับ 0.1068 และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (Observed Heterozygosity) คือ โอกาสที่จะพบจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสในสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 เท่ากับ 0.48 ซึ่งเป็นค่าที่สูงเนื่องจากค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตของสลิปส์สูงสุดคือค่าใกล้เคียง 0.5 (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 แสดงการทดสอบฮาร์ดี-ไวเบอร์กและค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตในกลุ่มควบคุม (250) สลิปส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน *COMT* ด้วยโปรแกรม PLINK

จีโนไทป์	จำนวน(ราย)	ร้อยละ	P-value HWE Test	ObsHET
GG	111	44.4	0.1068 HWE สมดุล	0.48
GA	120	48.0		
AA	19	7.6		

### การศึกษาความถี่ของแอลลีลของสไนปส์ตำแหน่ง rs4680 ในกลุ่มผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความถี่ของแอลลีลในผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสไนปส์ตำแหน่งดังกล่าวจากการวิเคราะห์กลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (188 ราย) ( $P = 0.9211$ ) และเมื่อวิเคราะห์ผู้ป่วยแยกตามลักษณะทางคลินิกหรือลักษณะทางฟีโนไทป์ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์ผู้ป่วยเพศชาย (156 ราย) และผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (146 ราย) ( $P = 0.8789$  และ  $0.7856$ ) ตามลำดับ (ตารางที่ 20)

เมื่อพิจารณาความถี่ของแอลลีลพบว่าแอลลีล G เป็น Major allele ที่พบมากในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ส่วนแอลลีล A จะเป็นแอลลีลที่พบน้อยกว่า (Minor allele) และความถี่ของแต่ละแอลลีลที่พบในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมนั้นไม่แตกต่างกัน ทำให้ไม่พบความแตกต่างของแอลลีลแต่ละแอลลีลที่ศึกษา ระหว่างผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 20 แสดงความถี่แอลลีลของสไนปส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน *COMT* ในผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม PLINK (df=1)

ลักษณะของผู้ป่วย	แอลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		$\chi^2$	P-value	OR (CI)
		จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่			
ผู้ป่วยทั้งหมด (188)	G	256	0.681	342	0.684	0.009823	0.9211	1.015 (0.7612-1.352)
	A	120	0.319	158	0.316			
ผู้ป่วยทั้งหมดเพศชาย (156)	G	215	0.689	342	0.684	0.02322	0.8789	0.9766 (0.7199-1.325)
	A	97	0.311	158	0.316			
ผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (146)	G	197	0.675	342	0.684	0.07401	0.7856	1.044 (0.7664-1.422)
	A	95	0.325	158	0.316			

### การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 ในกลุ่มผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความถี่ของจีโนไทป์ผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสไนป์ส์ตำแหน่งดังกล่าวจากการวิเคราะห์กลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (188 ราย) ( $P = 0.2583$ ) และเมื่อวิเคราะห์ผู้ป่วยแยกตามลักษณะทางคลินิกหรือลักษณะทางฟีโนไทป์ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์ผู้ป่วยเพศชาย (156 ราย) และผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (146 ราย) ( $P = 0.5509$  และ  $0.1698$ ) ตามลำดับ (ตารางที่ 21)

เมื่อพิจารณาความถี่ของจีโนไทป์พบว่าจีโนไทป์ GG พบมากที่สุดในแต่ละกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษาและความถี่ของแต่ละจีโนไทป์ที่พบในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมนั้น ไม่แตกต่างกันแม้จะแยกวิเคราะห์ตามลักษณะทางคลินิกหรือลักษณะทางฟีโนไทป์ก็ตาม ทำให้ไม่พบความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์แต่ละแบบระหว่างผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 21 แสดงความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน COMT ในผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม PLINK ( $df=2$ )

ลักษณะของผู้ป่วย	จีโนไทป์	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		$\chi^2$	P-value
		จำนวน (ราย)	ร้อยละ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ		
ผู้ป่วยทั้งหมด (188)	GG	89	47.3	111	44.4	2.707	0.2583 NS
	GA	78	41.5	120	48.0		
	AA	21	11.2	19	7.6		
ผู้ป่วยทั้งหมดเพศชาย (156)	GG	74	47.4	111	44.4	1.192	0.5509 NS
	GA	67	43.0	120	48.0		
	AA	15	9.6	19	7.6		
ผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (146)	GG	69	47.3	111	44.4	3.546	0.1698 NS
	GA	59	40.4	120	48.0		
	AA	18	12.3	19	7.6		



### การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 ในกลุ่มผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ Genetic model แบบต่าง ๆ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความถี่ของจีโนไทป์ผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ Genetic model แบบต่าง ๆ

การวิเคราะห์แบบ Additive model เป็นการศึกษาลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA และ  $\frac{1}{2}$  ของ GA เปรียบเทียบกับ GG และ  $\frac{1}{2}$  ของ GA ในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสลิปส์ตำแหน่งดังกล่าวจากการวิเคราะห์กลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (188 ราย) ผู้ป่วยเพศชาย (156 ราย) และผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (146 ราย) ( $P = 0.9193, 0.8745$  และ  $0.7813$ ) ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

การวิเคราะห์แบบ Dominant model ทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG เปรียบเทียบกับ AA และ GA ในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์กลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (188 ราย) ผู้ป่วยเพศชาย (156 ราย) และผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (146 ราย) ( $P = 0.5409, 0.5502$  และ  $0.5813$ ) ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

การวิเคราะห์แบบ Recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA เปรียบเทียบกับ GA และ GG ในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์กลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (188 ราย) ผู้ป่วยเพศชาย (156 ราย) และผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (146 ราย) ( $P = 0.1992, 0.4758$  และ  $0.1188$ ) ตามลำดับ (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 22 แสดงค่าความน่าจะเป็น (P-value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสลิปส์ ตำแหน่ง rs4680 บนยีน *COMT* ในผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ Genetic model

ลักษณะของผู้ป่วย	P-value		
	Additive model d.f.=1	Dominant model d.f.=1	Recessive model d.f.=1
ผู้ป่วยทั้งหมด (188)	0.9193 NS	0.5409 NS	0.1992 NS
ผู้ป่วยทั้งหมดเพศชาย (156)	0.8745 NS	0.5502 NS	0.4758 NS
ผู้ป่วยออกที่ซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (146)	0.7813 NS	0.5813 NS	0.1188 NS

**หมายเหตุ** การวิเคราะห์ในรูปแบบ Genetic model จากโปรแกรม PLINK โปรแกรมจะทำการคำนวณ Minor allele (A) และ Major allele (G)

Additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA และ ½ ของ GA เปรียบเทียบกับ GG และ ½ ของ GA

Dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG เปรียบเทียบกับ AA และ GA

Recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA เปรียบเทียบกับ GA และ GG

## การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Family-based study

### ความสัมพันธ์แบบ Family-based study ของส니ปส์ตำแหน่ง rs4818

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เพื่อดูอัตราการถ่ายทอดแอลลีลจากบิดามารดามาสู่ลูกที่เป็นโรค ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (160 ครอบครัว) มีค่า P-value เท่ากับ  $P = 0.6801$  มีอัตราการถ่ายทอดแอลลีล G จากบิดามารดามาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมไม่แตกต่างกับการถ่ายทอดแอลลีล C และเมื่อพิจารณาแยกผู้ป่วยวิเคราะห์ตามลักษณะทางคลินิกหรือฟีโนไทป์ การวิเคราะห์ผู้ป่วยเพศชาย (134 ครอบครัว) วิเคราะห์ผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (125 ครอบครัว) มีค่า P-value เท่ากับ 0.833 และ 0.5818 ตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 23 แสดงการถ่ายทอดแอลลีลของสนิปส์ตำแหน่ง rs4818 บนยีน COMT ในครอบครัวผู้ป่วยด้วยโปรแกรม PLINK

ลักษณะของผู้ป่วย	แอลลีล	ถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด	$\chi^2$	P-value	OR (CI)
ผู้ป่วยทั้งหมด (160)	G : C	71 : 76	0.1701	0.6801 NS	0.9342 (0.676-1.291)
ผู้ป่วยทั้งหมดเพศชาย (134)	G : C	55 : 65	0.8333	0.3613 NS	0.8462 (0.5909-1.212)
ผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (125)	G : C	51 : 59	0.5818	0.4456 NS	0.8644 (0.5943-1.257)

### คำอธิบาย

ถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด (71 : 76) หมายถึง มีการถ่ายทอดแอลลีล G แต่ไม่ถ่ายทอดแอลลีล C เท่ากับ 71 และมีการถ่ายทอดแอลลีล C แต่ไม่ถ่ายทอดแอลลีล G เท่ากับ 76

### ความสัมพันธ์แบบ Family-based study ของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680

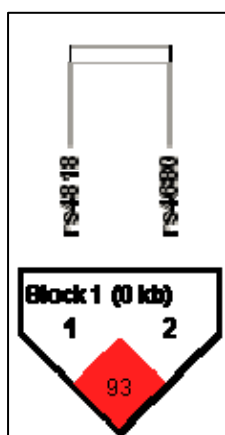
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เพื่อดูอัตราการถ่ายทอดแอลลีลจากบิดามารดามาสู่ลูกที่เป็นโรค ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (160 ครอบครัว) มีค่า P-value เท่ากับ  $P = 0.3508$  มีอัตราการถ่ายทอดแอลลีล A จากบิดามารดามาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมไม่แตกต่างกับการถ่ายทอดแอลลีล G และเมื่อพิจารณาแยกผู้ป่วยวิเคราะห์ตามลักษณะทางคลินิกหรือฟีโนไทป์ การวิเคราะห์ผู้ป่วยเพศชาย (134 ครอบครัว) วิเคราะห์ผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (125 ครอบครัว) มีค่า P-value เท่ากับ 0.4497 และ 0.1508 ตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 แสดงการถ่ายทอดแอลลีลของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 บนยีน *COMT* ในครอบครัวผู้ป่วยด้วยโปรแกรม PLINK

ลักษณะของผู้ป่วย	แอลลีล	ถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด	$\chi^2$	P-value	OR (CI)
ผู้ป่วยทั้งหมด (160)	A : G	75 : 64	0.8705	0.3508 NS	1.172 (0.8395-1.636)
ผู้ป่วยทั้งหมดเพศชาย (134)	A : G	60 : 52	0.5714	0.4497 NS	1.154 (0.7959-1.673)
ผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (125)	A : G	62 : 47	2.064	0.1508 NS	1.319 (0.903-1.927)

วิเคราะห์การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage Disequilibrium: LD) ของ  
 สนิปส์ตำแหน่ง rs4818 และตำแหน่ง rs4680 บนยีน *COMT*

ศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลตั้งแต่ 2 ตำแหน่งขึ้นไปอยู่ใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกัน มีโอกาสถ่ายทอดแอลลีลดังกล่าวไปด้วยกัน ศึกษาการถ่ายทอดสนิปส์แฮพลไทป์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดจำนวน 160 ครอบครัว จากลักษณะของสนิปส์ตำแหน่ง rs4818 ห่างจาก rs4680 ประมาณ 164 เบส ซึ่งมีระยะใกล้กันมากจึงมีการถ่ายทอดไปด้วยกันมีค่า  $D'$  เท่ากับ 0.93 (รูปที่ 63) การถ่ายทอดความถี่ของแฮพลไทป์พบได้ 4 แบบคือ CG CA GG GA โดยโปรแกรมจะไม่แสดงผลแฮพลไทป์ของ GA เนื่องจากมีจำนวนน้อยจะไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์และจากการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการถ่ายทอดแฮพลไทป์แต่ละแบบ (ตารางที่ 25)



รูปที่ 63 แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกันของสนิปส์ตำแหน่ง rs4818 และ rs4680 ตามลำดับบนยีน *COMT* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (160 ครอบครัว) จากการใช้โปรแกรมแฮพลไทป์วิเคราะห์การถ่ายทอดไปด้วยกันจะพิจารณาค่า  $D' \geq 0.8$

ตารางที่ 25 แสดงการถ่ายทอดความถี่แฮพลไทป์ของสไนป์ตำแหน่ง rs4818 และ rs4680 ตามลำดับบนยีน *COMT* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (160 ครอบครัว) จากการใช้โปรแกรมแฮพลอวิว

บล็อก	แฮพลไทป์	ความถี่	ความถี่ของ การถ่ายทอด: ไม่ถ่ายทอด	$\chi^2$	P-value
1	CG	0.360	65.1 : 69.3	0.128	0.72 NS
	CA	0.288	71.9 : 62.7	0.623	0.4301 NS
	GG	0.344	69.9 : 76.7	0.32	0.5719 NS
	GA	0.007	-	-	-

หมายเหตุ การศึกษาแฮพลไทป์เพื่อดูความถี่ของการถ่ายทอดจะวิเคราะห์เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด เนื่องค่าที่ได้ในการเมื่อแยกวิเคราะห์ผลตามลักษณะทางคลินิกหรือฟีโนไทป์ การวิเคราะห์ผู้ป่วยเพศชาย (134 ครอบครัว) วิเคราะห์ผู้ป่วยออทิซึมจากการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV (125 ครอบครัว) ค่าความน่าจะเป็น (P-value) ที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก

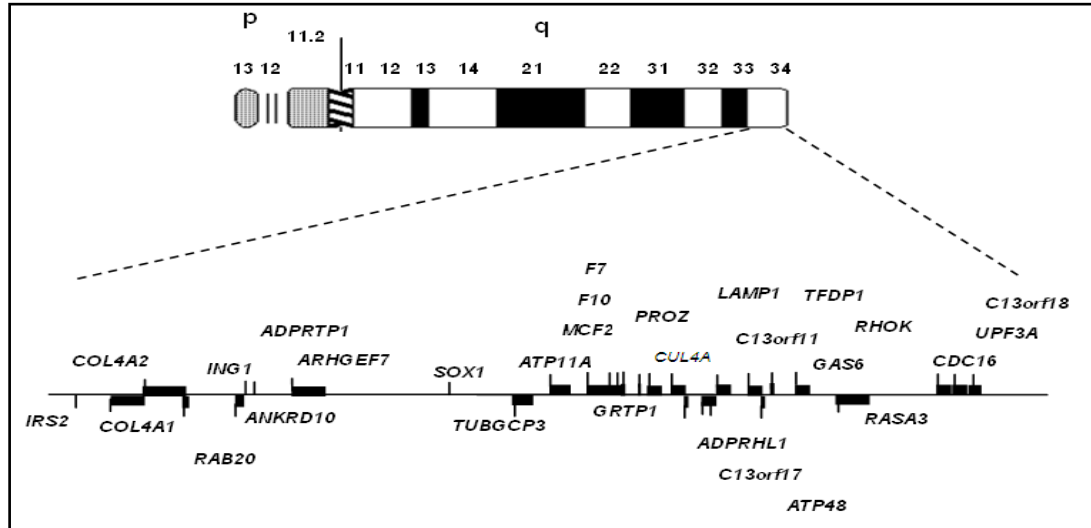
## บทที่ 4 บทวิจารณ์

### การตรวจกรองความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี GTG-banding

การเกิดโครโมโซมแบบวงแหวนเกิดจากการแตกหักและปลายทั้งสองข้างขาดหายไป เมื่อโครโมโซมแตกหักปลายที่หักนั้นจะมีลักษณะคล้ายเป็นปลายเหินๆ ไม่เสถียร โดยปกติเซลล์มีกลไกในการซ่อมแซมตัวเองได้ แต่หากแตกหักมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง การซ่อมแซมมักจะส่งผลให้มีการต่อติดผิดตำแหน่งได้ ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโครโมโซมแตกหัก มักเกิดจากสารเคมีที่มีผลต่อดีเอ็นเอ (Mutagen) หรือสารที่มีผลต่อโครโมโซม (Clastogen) เป็นต้น แต่ส่วนใหญ่มักไม่ทราบสาเหตุในผู้ป่วย

มีรายงานโครโมโซมแบบ r(13) ในผู้ป่วยออทิซึมเพียง 1 ราย โดย Assumpcao Jr และคณะ (2000) พบผู้ป่วยออทิซึมเพศหญิงชาวบราซิลอายุ 10 ปี 6 เดือน มีศีรษะเล็ก คางเล็ก ไม่พูด กล้ามเนื้อตึงตัวน้อย (Hypotonia) แต่เดินได้เองและช่วยเหลือตัวเองในชีวิตประจำวันได้ มีประวัติชักและได้รับการรักษาด้วยยากันชัก ไม่มีความผิดปกติของระบบประสาทอื่นๆ ผลการประเมินด้วย DSM-IV เข้ากับออทิซึม ส่วนผลการตรวจประเมินโดย Vineland Adaptive Behavior Scale ได้คะแนน 13 ซึ่งจัดอยู่ในปัญญาอ่อนระดับมาก (Profound mental retardation) ส่วนการศึกษา Verma และคณะ (1978) พบความผิดปกติของโครโมโซม 13 แบบวงแหวนโดยมีการขาดหายไปตำแหน่ง q34 ผู้ป่วยมีหน้าตาผิดปกติ ศีรษะเล็ก หัวใจพิการ ปัญญาอ่อนรุนแรง แต่ไม่มีรายงานอาการของออทิซึมไว้ รายงานผู้ป่วย r(13) ทั้งสองรายงานต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่ผู้ป่วยมีภาวะปัญญาอ่อนเล็กน้อยและไม่มีหน้าตาผิดปกติ อาจเนื่องมาจากบริเวณยีนที่ขาดหายไปแตกต่างกัน โดยเฉพาะส่วนปลายของโครโมโซม 13 เพราะ r(13) มักมีการขาดหายบริเวณ p12-p13 ซึ่งเป็นบริเวณ Nucleolus organizer region ที่ไม่มียีนที่สำคัญ แต่การขาดหายไปบริเวณปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม 13 อาจแตกต่างกัน ในรายงานของ Assumpcao Jr และคณะ (2000) ไม่ได้ระบุตำแหน่งที่ขาดหายไปไว้จึงไม่สามารถเปรียบเทียบได้ ส่วนรายงานของ Verma และคณะ (1978) มีจุดแตกหักที่บริเวณเดียวกันคือตำแหน่ง q34 ถึงปลายโครโมโซม แต่มีอาการรุนแรงมากกว่าผู้ป่วยในการศึกษาครั้งนี้ การบอกจุดแตกหักของโครโมโซมไม่ละเอียดมากพอที่จะบ่งบอกถึงยีนที่ขาดหายไปได้ ซึ่งคาดว่ามียีนที่อาจขาดหายไปประมาณ 30 ยีน (รูปที่ 64) ดังนั้นการขาดหายไประดับยีนของผู้ป่วยที่รายงานนี้น่าจะน้อยกว่ารายงานของ Verma และคณะ (1978) การตรวจระดับโครโมโซมด้วยเทคนิค GTG-banding

และจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH พบว่ามีการขาดหายไปของส่วนปลายของโครโมโซม 13 จริงแต่ไม่สามารถสรุปตำแหน่งที่ขาดหายไปได้ชัดเจน จึงควรมีการตรวจเพิ่มเติมด้วยเทคนิคตรวจระดับดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันผลที่ศึกษาต่อไป

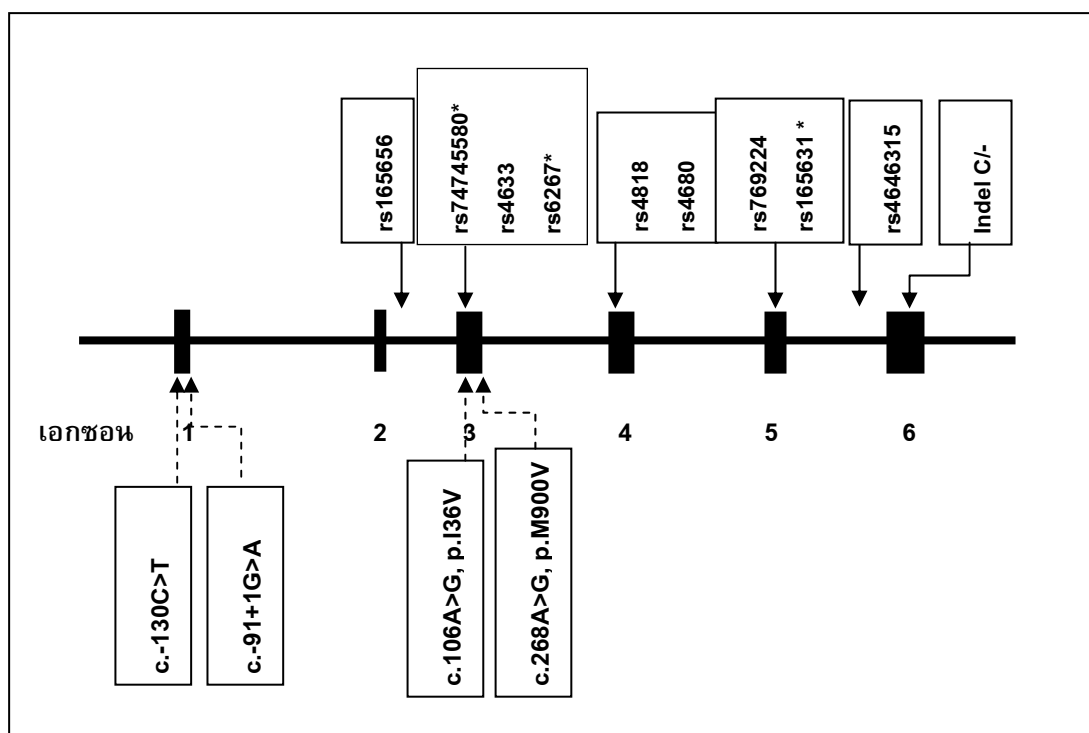


รูปที่ 64 แสดงยีนบนโครโมโซม 13 ตำแหน่ง q34 ถึงปลายโครโมโซมซึ่งคาดว่าจะมียีนที่ขาดหายไปผู้ป่วยรายนี้ (ดัดแปลงจาก <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr>)



## การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *COMT*

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *COMT* ทั้งหมด 6 เอกซอน พบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เคยมีรายงานแล้ว ความถี่ของแอลลีลจากการคำนวณในกลุ่มเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม (รูปที่ 65) พบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มประชากรชาวจีน ชาวญี่ปุ่น ชาวยุโรปและชาวแอฟริกัน ชับ-ชาฮาราจากการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap



รูปที่ 65 แสดงตำแหน่งสปีส์ที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *COMT* บริเวณเอกซอน 1 - 6 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม ลูกศรที่ด้านบนแสดงตำแหน่งของสปีส์ สัญลักษณ์ \* แสดงตำแหน่งสปีส์ที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย (Rare polymorphism) และลูกศรด้านล่างแสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบบริเวณเอกซอน 1 และ 3 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม 4 ราย ตามลำดับ

จากการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *COMT* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจำนวน 173 ราย พบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน 4 ตำแหน่งในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม 4 ราย คือ c.-130C>T (AR74-3), c.-91+1G>A (AR78-3), c.106A>G (AR29-3) และ c.268A>G (TM37-3)

## การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลต่อเอ็มอาร์เอ็นเอ

### การเปลี่ยนแปลงแบบ c.-130C>T

การเปลี่ยนแปลงแบบ c.-130C>T พบในผู้ป่วยเพศชาย (AR74-3) เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ c.-130C>T จากเบสไซโทซีนถูกแทนที่ด้วยเบสไทมีน บริเวณเอกซอน 1 เป็นลำดับเบสบนโมเลกุลดีเอ็นเอที่สามารถถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอได้ แต่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน

การศึกษาประวัติผู้ป่วยมีอาการเข้าได้กับออทิซึมสเปกตรัมแบบ PDD-NOS ตามเกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV ประวัติการคลอดปกติ น้ำหนักแรกคลอด 3,430 กรัม คลอดโดยวิธีผ่าตัดผ่านหน้าท้อง ไม่มีปัญหาขณะคลอด การทดสอบทางกายภาพ ไม่พบลักษณะผิดปกติใดๆ ผลการทดสอบสติปัญญาอยู่ในระดับภาวะปัญญาอ่อนระดับปานกลาง (IQ = 42) ผู้ป่วยเป็นคนสุดท้องจากพี่น้องทั้งหมด 2 คน จากข้อมูลประวัติครอบครัวพบพี่ชายของผู้ป่วยมีประวัติบกพร่องด้านการเรียน (Learning disability) และพบญาติของมารดามีปัญหาทางการพูดมักพูดสลับระหว่างประธานและกรรม พี่น้องทั้งฝ่ายบิดาและมารดามีปัญหาทางจิตเวช ลักษณะอาการหลักที่ผู้ปกครองพามาพบแพทย์คือพูดช้า

การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน แต่อาจจะส่งผลต่อการกระตุ้นหรือการยับยั้งการถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอจากยีน *COMT* บริเวณดังกล่าวผิดไปจากเดิม (รูปที่ 66) เนื่องจากการกระบวนการถอดรหัส เมื่อเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสมาจับที่จุดเริ่มต้นของยีนที่ด้าน 5' ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์และเริ่มถอดรหัสที่โคดอนเริ่มต้นและดำเนินไปจนถึงส่วนปลายของยีน 3' จากนั้นลำดับเบสของเอ็มอาร์เอ็นเอจะเป็นคู่สม (Complementary) จะอ่านสายดีเอ็นเอจากด้าน 3' ไปยัง 5' เพื่อสร้างอาร์เอ็นเอในทิศ 5' ไปยัง 3' โดยขั้นตอนนี้จะทำให้การสร้างสายอาร์เอ็นเอผิดไปจากเดิม เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไป

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงทำการวิเคราะห์และศึกษาเพิ่มเติม พบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดาที่มีจีโนไทป์ CT ส่วนมารดามีจีโนไทป์ CC (รูปที่ 54) การศึกษาในกลุ่มควบคุมจำนวน 115 ราย (230 แอลลีล) ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อดูว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวหรือไม่ (ตารางที่ 18) ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในกลุ่มควบคุม

จากการศึกษาคาดว่าการเปลี่ยนแปลงแบบ c.-130C>T ที่พบดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับอาร์เอ็นเอหรือเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้น้อย

### การเปลี่ยนแปลงแบบ c.-91+1G>A

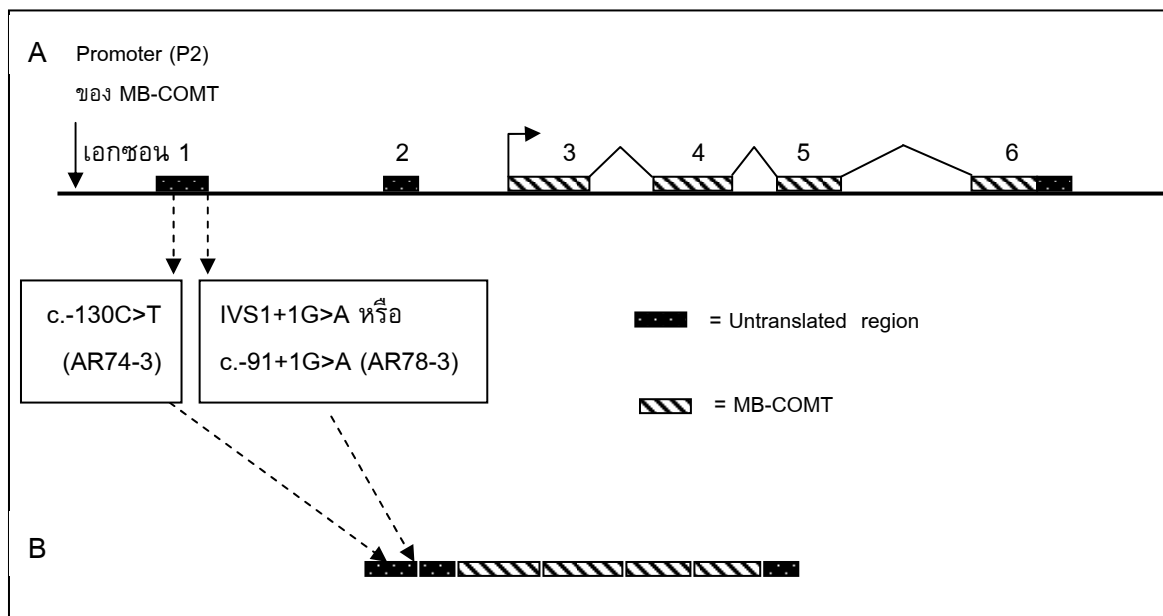
การเปลี่ยนแปลงแบบ c.-91+1G>A พบในผู้ป่วยเพศชาย (AR78-3) เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ c.-91+1G>A เกิดบริเวณรอยต่อระหว่างเอกซอนและอินทรอนเรียกว่า สไปลซิงไซต์ (Splicing site) (รูปที่ 66) จากเบสกวานีนถูกแทนที่ด้วยเบสอะดีนีน อาจส่งผลต่อการตัดต่ออาร์เอ็นเอผิดไปจากเดิม

การศึกษาประวัติผู้ป่วยมีอาการเข้าได้กับออทิซึมตามเกณฑ์การวินิจฉัยตาม DSM-IV ประวัติการคลอดปกติ น้ำหนักแรกคลอด 2,800 กรัม คลอดโดยวิธีธรรมชาติ ไม่มีปัญหาขณะคลอด การทดสอบทางกายภาพ ไม่พบลักษณะผิดปกติใดๆ ไม่มีผลการทดสอบสติปัญญา ผู้ป่วยเป็นลูกคนเดียว จากข้อมูลประวัติครอบครัวพบลูกของน้องชายมารดามีอาการชัก ลักษณะอาการหลักที่ผู้ปกครองพามาพบแพทย์คือยังไม่พูด

การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน แต่อาจจะส่งผลต่อการกระตุ้นหรือการยับยั้งการถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอจากยีน *COMT* บริเวณดังกล่าวผิดไปจากเดิม เนื่องจากการกระบวนการถอดรหัส มีขั้นตอน RNA processing โดยมีการตัดและเชื่อม (Excision and splicing) ซึ่งจะตัดรอยต่อระหว่างเอกซอนและอินทรอน (รูปที่ 66) โดยการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เกิดบริเวณรอยต่อดังกล่าว อาจส่งผลให้ไม่สามารถตัดรอยต่อระหว่างเอกซอนและอินทรอนได้ ทำให้ได้เอ็มอาร์เอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าปกติ

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงทำการวิเคราะห์และศึกษาเพิ่มเติม พบว่าการเปลี่ยนแปลง c.-91+1G>A ได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดาที่มีจีโนไทป์ GA ส่วนมารดามีจีโนไทป์ GG (รูปที่ 55) การศึกษาในกลุ่มควบคุมจำนวน 115 ราย (230 แอลลีล) ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 18)

จากการศึกษาคาดว่า การเปลี่ยนแปลงแบบ c.-91+1G>A ที่พบดังกล่าวจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับอาร์เอ็นเอและอาจส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน แต่อาจจะเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้น้อยได้ด้วยเช่นกัน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *COMT* ที่พบการเปลี่ยนแปลงข้างต้นเพื่อหาข้อสรุปที่ชัดเจนต่อไป



รูปที่ 66 แสดงโครงสร้างยีน *COMT* (A) แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอลูกศร (↓) แสดงตำแหน่งของโปรโมเตอร์ของ MB-COMT ลูกศร (↗) แสดงตำแหน่งการแปลรหัสเป็นโปรตีนรูปแบบ MB-COMT และลูกศร (↓) แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในผู้ป่วย 2 ราย บริเวณเอกซอน 1 (c.-130C>T) และบริเวณสไปลซิง (c.-91+1G>A) ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่างเอกซอน 1 และอินทรอน 1 (B) แสดงเอ็มอาร์เอ็นเอจากการเอาอินทรอนออกและนำเอกซอนมาต่อกัน

### การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลต่อโปรตีน

#### การเปลี่ยนแปลงแบบ p.I36V

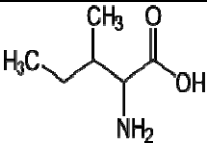
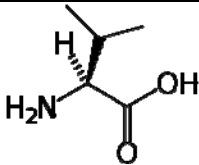
การเปลี่ยนแปลงแบบ p.I36V พบในผู้ป่วยเพศชาย (AR29-3) เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ c.106A>G จากเบสอะดีนีนถูกแทนที่ด้วยเบสกวานีน ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนไอโซลิวซีนถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนวาเลีน (p.I36V) เป็นการกลายพันธุ์แบบ Missense

การศึกษาประวัติผู้ป่วยมีอาการเข้าได้กับออทิซึมตามเกณฑ์การวินิจฉัยตาม DSM-IV ประวัติการคลออดปกติ น้ำหนักแรกคลอด 2,500 กรัม คลอดโดยวิธีผ่าตัดผ่านหน้าท้อง ไม่มีปัญหาขณะคลอด การทดสอบทางกายภาพ พบลักษณะผิดปกติของ Tongue tie ผลการทดสอบสติปัญญาอยู่ในระดับภาวะปัญญาอ่อนเล็กน้อย (IQ = 65) ผู้ป่วยเป็นคนสุดท้องจากพี่

น้องทั้งหมด 3 คน จากข้อมูลประวัติครอบครัวไม่พบความผิดปกติด้านใดด้านหนึ่ง โดยลักษณะอาการหลักที่ผู้ปกครองพามาพบแพทย์คือยังไม่พูด

การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากไอโซลิวซีนเป็นกรดอะมิโนวาเลีนเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มไม่มีขั้ว (Nonpolar) เหมือนกัน แต่มีผลมวลโมเลกุล (Molar mass) ต่างกัน (ตารางที่ 26) กล่าวคือกรดอะมิโนวาเลีนมีมวลโมเลกุลต่ำกว่าอาจจะส่งผลให้มวลโมเลกุลรวมของโปรตีน COMT ลดลง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลต่อโปรตีน COMT ในรูปแบบ MB-COMT แต่จะไม่ส่งผลต่อโปรตีน COMT ในรูปแบบ S-COMT เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโน 50 ตำแหน่งแรกจะพบในรูปแบบ MB-COMT เท่านั้น ทำให้กรดอะมิโนดังกล่าวมีพบบริเวณตอนต้นของโปรตีน MB-COMT ซึ่งจากการศึกษากรดอะมิโนประมาณ 50 ตัวแรกของโปรตีนรูปแบบ MB-COMT จะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนนี้อาจส่งผลให้การเกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์เกิดได้ไม่ดีพอ

ตารางที่ 26 แสดงลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง p.I36V

Amino acid	Isoleucine (Ile)	Valine (Val)
Molecular formula	$C_6H_{13}NO_2$	$C_5H_{11}NO_2$
Structure		
Properties		
1.Molar mass	131.17 g mol <sup>-1</sup>	117.15 g mol <sup>-1</sup>
2.Side chain polarity	Nonpolar	Nonpolar

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่ายังไม่เคยมีการรายงาน p.I36V มาก่อน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์แบบใหม่หรือเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบน้อย จึงยืนยันการเปลี่ยนแปลงที่พบดังกล่าวว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่อการเกิดออทิซึมหรือไม่ มีขั้นตอนการศึกษา 4 ขั้นตอนคือ

(1) การศึกษาการถ่ายทอดภายในครอบครัวของผู้ป่วย พบว่ามารดาจีโนไทป์ AG ส่วนบิดาไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเอจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ คาดว่าผู้ป่วยได้รับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมาจากมารดา (รูปที่ 56)

(2) การศึกษาในกลุ่มควบคุมจำนวน 115 ราย (230 แอลลีล) ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 18)

(3) การเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เพื่อดูว่าตำแหน่งกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นหรือไม่ พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 36 (p.I36V) เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ไม่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตที่ต่ำกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (รูปที่ 58) และเมื่อศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิพบว่าโครงสร้างของโปรตีน MB-COMT ที่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ในผู้ป่วยแตกต่างกับกลุ่มควบคุมโดยพบว่าโปรตีน MB-COMT ของผู้ป่วยมีโครงสร้างแบบเฮลิคซ์ที่สั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบริเวณตอนต้นก่อนถึงการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเป็นวาเลีน ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน MB-COMT ที่ตำแหน่ง p.I36V (รูปที่ 60)

(4) การศึกษาการทำงานของโปรตีน MB-COMT ยังไม่มีการศึกษาการทำงานของโปรตีน MB-COMT ที่ตำแหน่ง p.I36V

จากการศึกษาได้นำเอาเครื่องมือทางชีวสารสนเทศมาใช้ในการทำนายและแปลผลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเป็นโปรแกรม Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (ตามวิธีทำนายกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงในบทที่ 2) เป็นการเปรียบเทียบโดยการทำ Alignment ระหว่างยีนที่มีความสัมพันธ์หรือเกี่ยวเนื่องกันระหว่างโดเมนของแต่ละสปีชีส์ในการทำนายความเป็นไปได้ของกรดอะมิโนที่ถูกแทนที่ ผลการศึกษาพบว่าอาจไม่ส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของโปรตีน MB-COMT เนื่องจากมีค่าความเป็นไปได้มากกว่า 0.05 (0.12) (รูปที่ 13 และ 14)

### การเปลี่ยนแปลงแบบ p.M90V

การเปลี่ยนแปลงแบบ p.M90V พบในผู้ป่วยหญิง (TM37-3) เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ c.268A>G จากเบสอะดีนีนถูกแทนที่ด้วยเบสกวานีน ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเมทไทโอนีนถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนวาเลีน (p.M90V) เป็นการกลายพันธุ์แบบ Missense

การศึกษาประวัติผู้ป่วยมีอาการเข้าได้กับออทิซึมตามเกณฑ์การวินิจฉัยตาม DSM-IV ประวัติการคลอดปกติ น้ำหนักแรกคลอด 4,000 กรัม คลอดโดยวิธีธรรมชาติ ไม่มีปัญหาขณะคลอด การทดสอบทางกายภาพ ไม่พบลักษณะผิดปกติใดๆ ผลการทดสอบสติปัญญาด้วยแบบทดสอบอยู่ในระดับภาวะปัญญาอ่อนเล็กน้อย (IQ = 60) ผู้ป่วยเป็นคนสุดท้องจากพี่น้องทั้งหมด 3 คน จากข้อมูลประวัติครอบครัวพบพี่ชายมีประวัติพูดช้า โดยเริ่มพูดตอน 3 ขวบ และพบอาการมารดามีอาการชัก โดยลักษณะอาการหลักที่ผู้ปกครองพามาพบแพทย์คือยังไม่พูด

การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากเมทไทโอนีนเป็นกรดอะมิโนวาเลีน เป็นกรดอะมิโนกลุ่มไม่มีขั้ว (Nonpolar) เหมือนกัน แต่มีผลมวลโมเลกุล (Molar mass) ต่างกัน (ตารางที่

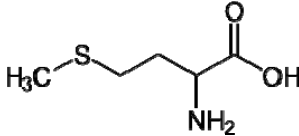
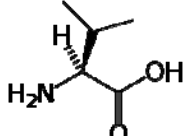
27) คือกรดอะมิโนวาเลอีนมีมวลโมเลกุลต่ำกว่าว่าจะส่งผลให้มวลโมเลกุลรวมของโปรตีน COMT ลดลง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลต่อโปรตีน COMT ทั้งสองรูปแบบ คือ MB-COMT ตำแหน่ง p.M90V และรูปแบบ S-COMT ตำแหน่ง p.M40V เนื่องจากพบกรดอะมิโนดังกล่าวทั้ง รูปแบบ MB-COMT และ S-COMT แต่มีตำแหน่งโคดอนต่างกัน

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่ายังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์แบบใหม่หรือเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้น้อยจึงยืนยันการเปลี่ยนแปลงที่พบดังกล่าวเป็นการกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่อการเกิดออกซิซึมหรือไม่ มีขั้นตอนการศึกษา 4 ขั้นตอนคือ

(1) การศึกษาการถ่ายทอดภายในครอบครัวของผู้ป่วย พบว่ามารดามีจีโนไทป์ AG บิดามีจีโนไทป์ AA ดังนั้นผู้ป่วยได้รับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมาจากมารดา (รูปที่ 57)

(2) การศึกษาในกลุ่มควบคุมจำนวน 115 ราย (230 แอลลีล) ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 27 แสดงลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง p.M90V

Amino acid	Methionine (Met)	Valine (Val)
Molecular formula	$C_5H_{11}NO_2S$	$C_5H_{11}NO_2$
Structure		
Properties		
1. Molar mass	149.21 g mol <sup>-1</sup>	117.15 g mol <sup>-1</sup>
2. Side chain polarity	Nonpolar	Nonpolar

(3) การเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เพื่อดูว่าตำแหน่งกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นหรือไม่ พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 90 (p.M90V) เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (รูปที่ 59) และเมื่อศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิพบว่าโครงสร้างของโปรตีน MB-COMT ที่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในผู้ป่วยไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่ได้บอกผลของโปรตีนในระดับเซลล์เป็นเพียงการสร้างโครงสร้างจำลองเท่านั้น (รูปที่ 61)

(4) การศึกษาการทำงานของโปรตีน MB-COMT และ S-COMT ยังไม่มีการศึกษาการทำงานของโปรตีนที่ตำแหน่ง p.M90V และ p.M40V ตามลำดับ

จากการทำนายด้วยโปรแกรม Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) พบว่า อาจไม่ส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของโปรตีน MB-COMT เนื่องจากมีค่าความเป็นไปได้มากกว่า 0.05 (0.29) (รูปที่ 13)

ข้อสังเกตอย่างหนึ่งคือไม่มีรายงานการกลายพันธุ์ของยีน *COMT* ในฐานข้อมูล (The Human Gene Mutation database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff) อาจจะเป็นไปได้ว่ายีน *COMT* มีความสำคัญต่อเซลล์ เมื่อมีความผิดปกติอาจจะทำให้เซลล์ไม่สามารถทำงานได้และตายไป โดยโปรตีน *COMT* ทั้งสองรูปแบบจะมีหน้าที่ในควบคุมสารจำพวกแคทีโคลามีนเหมือนกัน ในระดับเซลล์พบโปรตีน S-COMT อยู่ในไซโทพลาซึม (Tilgmann et al., 1992) ส่วนโปรตีน MB-COMT เกาะติดกับเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบและส่วนที่เหลือของ MB-COMT อยู่ในไซโทพลาซึม (Tilgmann et al., 1992; Tenhunen and Ulmanen, 1993; Ulmanen et al., 1997) ส่วนในระดับเนื้อเยื่อพบโปรตีน S-COMT มาก ต่ำ ใต้ และโปรตีน MB-COMT พบมากในสมอง (Tenhunen and Ulmanen, 1993; Tenhunen et al., 1994) ดังนั้นอาจเป็นไปได้เมื่อยีน *COMT* มีความผิดปกติอาจจะส่งผลต่อโปรตีน S-COMT และ MB-COMT ในระดับเซลล์และเนื้อเยื่อ

การศึกษานี้เป็นรายงานครั้งแรกในการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *COMT* ในผู้ป่วยออทิซึมและพบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 2 แบบคือ c.106A>G (p.I36V) และ c.268A>G (p.M90V) ซึ่งอาจจะเป็นการกลายพันธุ์แบบใหม่หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้น้อย จึงน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำงานของโปรตีน MB-COMT ที่พบการเปลี่ยนแปลงใหม่นี้เพื่อหาข้อสรุปที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

## ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Population-based case control study

การศึกษาความสัมพันธ์แบบ Population-based case-control เป็นการเปรียบเทียบความถี่ของแอลลีลและจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม การพิจารณาเลือกกลุ่มควบคุมที่นำมาศึกษาจะต้องคำนึงถึง เพศ เชื้อชาติ ภูมิภาคซึ่งควรสอดคล้องกับกลุ่มผู้ป่วยเพื่อลดการเกิดผลบวกปลอมจากความเป็นชั้นภูมิของประชากร (Population Stratification) และต้องตรวจสอบค่าสภาวะสมดุลของฮาร์ดี-ไวเบอร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) ค่าความน่าจะเป็นที่ยอมรับในการศึกษานี้กำหนดไว้มากกว่า 0.05 ( $P > 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ ( $P = 0.1068$ ) และควรพิจารณาค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตคือ



โอกาสที่จะพบแอลลีลแบบเฮเทอโรไซกัสซึ่งเป็นค่าที่สูงเป็นการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่สูงมาก ทำให้การศึกษานิปส์ตำแหน่งดังกล่าว (rs4680) มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความถี่ของแอลลีลและจีโนไทป์ในผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของนิปส์ตำแหน่งดังกล่าวโดย พบแอลลีล G เป็นแอลลีลที่พบบ่อย (Major allele) ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ส่วนแอลลีล A จะเป็นแอลลีลที่พบน้อยกว่า (Minor allele) สอดคล้องกับแอลลีลที่มีรายงานในกลุ่มประชากรชาวจีน ชาวญี่ปุ่น ชาวยุโรปและชาวแอฟริกัน ชับ-ชาฮาราจากฐานข้อมูล NCBI และ Hapmap และชาวไทยจากฐานข้อมูล ThaiSNP (ตารางที่ 13) มีผลไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้คือมีแอลลีล G เป็นแอลลีลที่พบบ่อยและแอลลีล A เป็นแอลลีลที่พบน้อยกว่า

การศึกษาความสัมพันธ์ของนิปส์ตำแหน่ง rs4680 กับผู้ป่วยออทิซึมมีการศึกษาน้อยมาก การศึกษาของ James และคณะ (2006) พบแอลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม (53%) และพบแอลลีล G ในกลุ่มควบคุม (46%) โดยพบว่าจะมีโอกาสพบแอลลีล G ดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมประมาณ 1.31 เท่า (Odd ratio) ของกลุ่มควบคุม ซึ่งต่างกับการศึกษาครั้งนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่พบแอลลีล G (68.1%) ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (68.4%) โดยความถี่ของแอลลีล G ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ไม่แตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม การวิเคราะห์โอกาสพบแอลลีล G ในผู้ป่วยออทิซึมประมาณ 1.01 (Odd ratio) ของกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ James และคณะ (2006) ยังพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจีโนไทป์ GG ในผู้ป่วยออทิซึม (29%) มากกว่าพบในกลุ่มควบคุม (20%) และโอกาสที่พบจีโนไทป์ GG ในผู้ป่วยสูงถึงประมาณ 1.74 เท่าของกลุ่มควบคุมซึ่งต่างกับการศึกษาครั้งนี้ที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบจีโนไทป์แต่ละแบบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 28)

ส่วนการศึกษาของ Gadow และคณะ (2009) ศึกษาการเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมที่มีจีโนไทป์ GG (Met158-) กับกลุ่มจีโนไทป์ AA หรือ GA (Met158+) ตามลักษณะทางคลินิกร่วมโดยการประเมินเป็นคะแนนมาตรฐาน (CSI-4, Child Symptom Inventory-4) เช่น Generalized anxiety, Separated anxiety, ADHD, Social phobia และ Tics โดยพบกลุ่ม Met158+ มีค่าเฉลี่ยของคะแนน Social phobia สูงกว่ากลุ่ม Met158- (1.9 vs 0.8) ด้วยค่ามีนัยสำคัญทางสถิติใกล้ 0.05 ( $P = 0.06$ ) (ตารางที่ 28) การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาในลักษณะเดียวกับ Gadow และคณะ (2006) แต่ถ้าหากเปรียบเทียบความถี่ของแอลลีลและจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมกับกลุ่มควบคุมพบจีโนไทป์แบบ GG สูงกว่าจีโนไทป์ AA เนื่องจาก G เป็นแอลลีลที่พบบ่อยทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ส่วน A จะเป็นแอลลีลที่พบน้อยเสมอในทุกลักษณะของผู้ป่วยที่วิเคราะห์ตามลักษณะทางคลินิกทางปรากฏ

การศึกษาของ Chen และคณะ (2004) ศึกษาการทำงานของสไนป์ซินในยีน *COMT* (Functional polymorphism) โดยได้ศึกษาเอ็มอาร์เอ็นเอ โปรตีนและการทำงานของ เอนไซม์ในยีน *COMT* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองและเลือดเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบดูความแตกต่างที่เกิดขึ้น มีการศึกษาสไนป์ตำแหน่ง rs4680 ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบสตัวที่ 3 โดยเบส G ถูกแทนที่ด้วยเบส A ที่ใช้ในการแปลรหัสกรดอะมิโนจึงก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของ กรดอะมิโนจากวาเลีนเป็นเมทไทโอนีน โดยพบว่ากรดอะมิโนวาเลีนจะมีความเสถียรและความคงตัวสูงกว่ากรดอะมิโนเมทไทโอนีนจากการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากการศึกษา โปรตีนรูปแบบ MB-COMT พบว่ากรดอะมิโนวาเลีนมีการทำงานที่สูงมาก (High activity) ของ โปรตีน COMT อาจส่งผลต่อระบบการควบคุมระดับโดปามีนบริเวณสมองส่วนหน้าให้ลดต่ำลง ได้และจากการศึกษาครั้งนี้พบแอลลีล G (กรดอะมิโนวาเลีน) ซึ่งเป็นแอลลีลที่พบได้บ่อยทั้งใน กลุ่มผู้ป่วยออทิซึมและกลุ่มควบคุมโดยไม่พบความแตกต่างจากการเปรียบเทียบทั้งสองกลุ่ม จึง คาดเดาได้ว่าแอลลีล G ที่พบมากนั้นไม่น่าจะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะออทิซึม

ตารางที่ 28 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมจากการศึกษาแบบ Population-based case control study

การศึกษา	กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา	การวิเคราะห์ทางสถิติ	ผลการศึกษา
James และคณะ (2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ผู้ป่วยออทิซึม 360 ราย ใช้เกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV, ADOS หรือ CARS</li> <li>● กลุ่มควบคุม 205 ราย</li> <li>● ชาวยุโรป</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมโดยใช้ Student's t-test</li> <li>● การวิเคราะห์จีโนไทป์แบบ Linear Regression และ Chi-square test</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแอลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม (53%) และพบแอลลีล G ในกลุ่มควบคุม (46%) โดยพบว่าจะมีโอกาสพบแอลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมประมาณ 1.31 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม</li> <li>● พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจีโนไทป์ GG ในผู้ป่วยออทิซึม (29%) และพบในกลุ่มควบคุม (20%) จึงพบว่าโอกาสที่พบจีโนไทป์ GG ในผู้ป่วยสูงถึงประมาณ 1.74 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม</li> </ul>
Gadow และคณะ (2009)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ผู้ป่วยออทิซึม 67 ราย ใช้เกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV</li> <li>● ชาวยุโรป</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Chi-square test และ ANOVAs</li> <li>● ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Population-base case control study</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● * โดยพบกลุ่มออทิซึมที่มี Met158+ มีค่าเฉลี่ยของคะแนน social phobia สูงกว่ากลุ่มออทิซึม Met158- (1.9 vs 0.8) ด้วยค่านัยสำคัญทางสถิติใกล้ 0.05 (P =0.06) * จีโนไทป์ GG (Met158-), กลุ่มจีโนไทป์ AA, AG (Met158+)</li> </ul>
การศึกษาครั้งนี้	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ผู้ป่วยออทิซึม 188 ราย ใช้เกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV</li> <li>● กลุ่มควบคุม 250 ราย</li> <li>● ชาวไทย</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Chi-square test</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแอลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วย (68.1%) กลุ่มควบคุม (68.4%)</li> <li>● ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจีโนไทป์แต่ละแบบทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม</li> </ul>

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Family-based study

การศึกษาความสัมพันธ์แบบ Family-based study ศึกษาการถ่ายทอดของ แอลลีลจากบิดามารดามายังลูกว่ามีอัตราการถ่ายทอดของแอลลีลใดมาสู่ลูกที่เป็นโรคมากกว่ากัน ผลการศึกษาจากการแยกลักษณะต่างๆ ของผู้ป่วยตามลักษณะทางคลินิก ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากอัตราการถ่ายทอดแอลลีล G หรือ C ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4818 และไม่พบความแตกต่างจากการถ่ายทอดแอลลีล G หรือ A ของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 จากบิดาหรือมารดามาสู่ลูกเช่นเดียวกัน

การศึกษาสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4818 มีการศึกษาน้อยเนื่องจากเป็นสไนป์ส์ที่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน การศึกษาส่วนใหญ่จึงมักศึกษาสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 ซึ่งเป็นสไนป์ส์ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน COMT

การศึกษาความสัมพันธ์ของ Yirmiya และคณะ (2001) ศึกษาสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4680 ร่วมกับยีนอื่นๆ ในผู้ป่วยออทิซึม ไม่พบความแตกต่างจากการถ่ายทอดแอลลีลทั้งสอง เช่นเดียวกับการศึกษานี้ (ตารางที่ 29) แต่มีความแตกต่างด้านขนาดตัวอย่างที่ศึกษาเนื่องจากงานวิจัยของ Yirmiya และคณะ (2001) มีกลุ่มผู้ป่วยเพียง 34 ครอบครัว แต่การวิจัยครั้งนี้มีกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 160 ครอบครัว จึงเป็นที่น่าเชื่อถือกว่าและยังมีการวิเคราะห์โดยแยกประเภททางลักษณะทางคลินิกที่ปรากฏเพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือมากขึ้น

การศึกษาการถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage Disequilibrium: LD) ของสไนป์ส์ ตำแหน่ง rs4818 และตำแหน่ง rs4680 ศึกษาการถ่ายทอดสไนป์ส์แฮพลไทป์ของสไนป์ส์ทั้งสอง ตำแหน่งพบว่าการถ่ายทอดไปด้วยกันเนื่องจากเป็นสไนป์ส์ที่อยู่บริเวณเอกซอน 4 ทั้งคู่โดยมีระยะห่างระหว่างเบสเพียง 164 เบส ซึ่งใกล้กันมากจึงควรถ่ายทอดไปด้วยกันและข้อดีของการศึกษาคือสามารถตรวจสอบผลของจีโนไทป์ทั้งสองตำแหน่งได้ การถ่ายทอดความถี่ของแฮพลไทป์พบได้ 4 แบบคือ CG CA GG GA ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการถ่ายทอดแฮพลไทป์แต่ละแบบ

ตารางที่ 29 แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมจากการศึกษาแบบ Family-based study

การศึกษา	กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา	การวิเคราะห์ทางสถิติ	ผลการศึกษา
Yirmiya และคณะ (2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ผู้ป่วยออทิซึม 34 ครอบครัว ใช้เกณฑ์วินิจฉัย DSM-III-R, DSM-IV และ ADI-R</li> <li>● ชาวอิสราเอล</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Chi-square test</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ไม่พบความแตกต่างจากการถ่ายทอดแอลลีล A และ แอลลีล G ของบิดาและมารดามาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ</li> </ul>
การศึกษาคั้งนี้	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ผู้ป่วยออทิซึม 160 ครอบครัว ใช้เกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV</li> <li>● ชาวไทย</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Chi-square test</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการถ่ายทอดแอลลีล A หรือ G ของบิดามารดามาสู่ลูกที่เป็นออทิซึม</li> </ul>

การศึกษาความสัมพันธ์แบบ Population-based case control study และแบบ Family-based study ของยีน *COMT* กับภาวะออทิซึมมีน้อยมาก และจากรายงานของ James และคณะ (2006) ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้กับการศึกษาคั้งนี้แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีเชื้อชาติต่างกัน ขนาดตัวอย่างที่ศึกษาต่างกัน เพราะการเกิดภาวะออทิซึมมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยหรือมียีนหลายยีนเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *COMT* ตำแหน่ง rs4680 อาจไม่มีผลต่อการเกิดออทิซึมสเปคตรัมในประเทศไทยกลุ่มนี้ แต่อย่างไรก็ตามอาจจะจำเป็นต้องศึกษาดำเนินการตำแหน่งสลิปส์ของยีน *COMT* ในตำแหน่งอื่นๆ กับประชากรกลุ่มนี้หรือกลุ่มอื่นๆ หรือศึกษาในลักษณะทางคลินิกแบบต่างๆ ตามการศึกษาของ Gadow และคณะ (2009) เพื่อให้มีข้อมูลมากขึ้นว่ายีน *COMT* เป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดออทิซึมหรือไม่

## บทที่ 5

### บทสรุป

การเกิดโครโมโซมแบบวงแหวนพบได้น้อยมากในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม ลักษณะอาการทางคลินิกขึ้นกับขนาดของชิ้นส่วนที่ขาดหายไป ดังนั้นการตรวจกรองความผิดปกติของโครโมโซมเป็นมาตรฐานการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพื่อหาสาเหตุของโรค ก่อนการสืบหาสาเหตุอื่นๆ ต่อไป

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *COMT* ในการศึกษาที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสลิปส์ตำแหน่ง rs165656, rs4633, rs4818, rs4680, rs769224 และ rs4646315 พบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบน้อยของสลิปส์ตำแหน่ง rs74745580, rs6267 และ rs165631 พบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ไม่สามารถระบุว่าเป็นการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นมา (IndelC/-) บริเวณเอกซอน 6 พบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน 4 ตำแหน่ง คือ c.-130C>T, c.-91+1G>A, c.106A>G (p.I36V) และ c.268A>G (p.M90V) ซึ่งควรมีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *COMT* ที่มีการเปลี่ยนแปลงใหม่ต่อไป

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *COMT* ในเด็กไทยที่พบออทิซึมสเปคตรัม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสลิปส์ตำแหน่ง rs4680 จากการวิเคราะห์แบบ Population-based case control study และแบบ Family-based study การศึกษาแฮปโลไทป์เพื่อศึกษาการถ่ายทอดของสลิปส์ 2 ตำแหน่ง (rs4818 และ rs4680) มีการถ่ายทอดไปด้วยกันแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแฮปโลไทป์แต่ละแบบ

ดังนั้นการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ายีน *COMT* เป็นปัจจัยส่งเสริมต่อการเกิดออทิซึมสเปคตรัมในเด็กไทยจึงควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

## รายการเอกสารอ้างอิง

- ราตรี สุดทรวง และวีระชัย สิงหนิยม. 2550. ประสาทสรีรวิทยา. ใน สารสื่อประสาท. รวีวรรณ จันทรมั่น บรรณาธิการ. พิมพ์ครั้งที่ 5. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ หน้า 179-183.
- วสันต์ จันทราทิตย์, ชลภัทร สุขเกษม และสุรค์เมธ มหาศิริมงคล. 2551. วิเคราะห์เจาะลึกจีโนมมนุษย์ด้วยชีวสารสนเทศ Use of Bioinformatics for Extensive Genome Analysis. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทกราฟิคฮัท จำกัด: กรุงเทพฯ.
- Allahabadia, A. and Gough, S. C. 1999. The different approaches to the genetic analysis of autoimmune thyroid disease. *Journal of Endocrinology*. 163(1): 7-13.
- Alsobrook, J. P., 2nd, Zohar, A. H., Leboyer, M., Chabane, N., Ebstein, R. P. and Pauls, D. L. 2002. Association between the COMT locus and obsessive-compulsive disorder in females but not males. *American Journal of Human Genetics*. 114(1): 116-120.
- American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorder, fourth edition (DSM-IV). Washington DC. American Psychiatry Association.
- Antonarakis, S. E. 1998. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature working group. *Human Mutation*. 11(1): 1-3.
- Ashley-Koch, A., Wolpert, C. M., Menold, M. M., Zaeem, L., Basu, S., Donnelly, S. L., Ravan, S. A., Powell, C. M., Qumsiyeh, M. B., Aylsworth, A. S., Vance, J. M., Gilbert, J. R., Wright, H. H., Abramson, R. K., DeLong, G. R., Cuccaro, M. L. and Pericak-Vance, M. A. 1999. Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics*. 61(3): 227-236.
- Assumpcao, Jr. FB. Kuczyski, E. and de Almeida Rocca Castanho, C. 2006. Autism and ring chromosome 13. *The Hong Kong Journal of Psychiatry*. 10(4): 25-26.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E. and Rutter, M. 1995. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological Medicine*. 25(1): 63-77.
- Bailey, A., Palferman, S., Heavey, L. and Le Couteur, A. 1998. Autism: The phenotype in relatives. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 28(5): 369-392.

- Baker, K., Baldeweg, T., Sivagnanasundaram, S., Scambler, P. and Skuse, D. 2005. COMT Val108/158Met modifies mismatch negativity and cognitive function in 22q11 deletion syndrome. *Biological Psychiatry*. 58(1): 23-31.
- Behjati, F., Shafaghati, Y., Firouzabadi, S. G., Kahrizi, K., Bagherizadeh, I., Najmabadi, H., Bint, S. and Ogilvie, C. 2008. M-banding characterization of a 16p11.2p13.1 tandem duplication in a child with autism, neurodevelopmental delay and dysmorphism. *European Journal of Medical Genetics*. 51(6): 608-614.
- Benvenuto, A., Moavero, R., Alessandrelli, R., Manzi, B. and Curatolo, P. 2009. Syndromic autism: Causes and pathogenetic pathways. *World Journal Of Pediatrics*. 5(3): 169-176.
- Bertocci, B., Miggiano, V., Da Prada, M., Dembic, Z., Lahm, H. W. and Malherbe, P. 1991. Human catechol-O-methyltransferase: Cloning and expression of the membrane-associated form. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88(4): 1416-1420.
- Beuten, J., Payne, T. J., Ma, J. Z. and Li, M. D. 2006. Significant association of catechol-O-methyltransferase (COMT) haplotypes with nicotine dependence in male and female smokers of two ethnic populations. *Neuropsychopharmacology*. 31(3): 675-684.
- Bloom, S. E. and Goodpasture, C. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Human Genetics*. 34(2): 199-206.
- Brahe, C.; Bannetta, P.; Meera Khan, P.; Arwert, F. and Serra, A. 1986. Assignment of the catechol-O-methyltransferase gene to human chromosome 22 in somatic cell hybrids. *Human Genetics*. 74(3): 230-234.
- Bundey, S., Hardy, C., Vickers, S., Kilpatrick, M. W. and Corbett, J. A. 1994. Duplication of the 15q11-13 region in a patient with autism, epilepsy and ataxia. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 36(8): 736-742.
- Calvo, S., Collins, H., Selmer, S. and Synder, M. 2009. Genetics Home Reference. <http://ghr.nlm.nih.gov/> (accessed 06/16/09), part of COMT. <http://ghr.nlm.nih.gov/search?query=COMT> (accessed 06/16/09).



- Caspersson, T., Zech, L. and Johansson, C. 1970. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Experimental Cell Research*. 62(2): 490-492.
- Caspi, A., Langley, K., Milne, B., Moffitt, T. E., O'donovan, M., Owen, M. J., Polo Tomas, M., Poulton, R., Rutter, M., Taylor, A., Williams, B. and Thapar, A. 2008. A replicated molecular genetic basis for subtyping antisocial behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Archives of General Psychiatry*. 65(2): 203-10.
- Chen, J., Lipska, B. K., Halim, N., Ma, Q. D., Matsumoto, M., Melhem, S., Kolachana, B. S., Hyde, T. M., Herman, M. M., Apud, J., Egan, M. F., Kleinman, J. E. and Weinberger, D. R. 2004. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *The American Journal of Human Genetics*. 75(5): 807-821.
- Cook, E. H. 2001. Genetics of autism. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*. 10(2): 333-350.
- den Dunnen, J. T. and Antonarakis, S. E. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *Human Mutation*. 15(1): 7-12.
- den Dunnen, J. T. and Antonarakis, S. E. 2001. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Human Genetics*. 109(1): 121-124.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. and Dveksler, G. S. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research*. 3(3): S30-37.
- Egan, M. F., Goldberg, T. E., Kolachana, B. S., Callicott, J. H., Mazzanti, C. M., Straub, R. E., Goldman, D. and Weinberger, D. R. 2001. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 98(12): 6917-6922.
- Emilie, H.M. 1985. Preparation of chromosomes from humand blood culture. *Genetics Laboratory Kennedy Krieger Institute*. Baltimore. Maryland 21205.
- Faras, H., Al Ateeqi, N. and Tidmarsh, L. 2010. Autism spectrum disorders. *Annals of Saudi Medicine*. 30(4): 295-300.

- Fombonne, E. 2003. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: An update. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 33(4): 365-382.
- Fombonne, E. 2005. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *Journal of Clinical Psychiatry*. 66(10): 3-8.
- Freitag, C. M. 2007. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: A review of the literature. *Molecular Psychiatry*. 12(1): 2-22.
- Funke, B., Malhotra, A. K., Finn, C. T., Plocik, A. M., Lake, S. L., Lencz, T., Derosse, P., Kane, J. M. and Kucherlapati, R. 2005. COMT genetic variation confers risk for psychotic and affective disorders: A case control study. *Behavioral and Brain Functions*. 1:19.
- Gadow, K. D., Roohi, J., Devinent, C. J., Kirsch, S. and Hatchwell, E. 2009. Association of COMT (Val158Met) and BDNF (Val66Met) gene polymorphisms with anxiety, ADHD and tics in children with autism spectrum disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 39(11): 1542-1551.
- Ghaziuddin, M. and Burmeister, M. 1999. Deletion of chromosome 2q37 and autism: A distinct subtype? *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 29(3): 259-263.
- Gillberg, C. 1998. Chromosomal disorders and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 28(5): 415-425.
- Giller, E. L., Jr., Young, J. G., Breakefield, X. O., Carbonari, C., Braverman, M. and Cohen, D. J. 1980. Monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activities in cultured fibroblasts and blood cells from children with autism and the gilles de la tourette syndrome. *Psychiatry Research*. 2(2): 187-197.
- Grossman, M. H., Littrell, J., Weinstein, R., Punnett, H. H., Emanuel, B. S. and Budarf, M. 1991. The gene for human catechol-O-methyltransferase (COMT) maps to 22pter-22q11.1. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 58: 2048.
- Gutierrez, B., Bertranpetit, J., Guillamat, R., Valles, V., Arranz, M. J., Kerwin, R. and Fananas, L. 1997. Association analysis of the catechol O-methyltransferase gene and bipolar affective disorder. *American Journal of Psychiatry*. 154(1): 113-115.

- Heward, J. M., Allahabadia, A., Daykin, J., Carr-Smith, J., Daly, A., Armitage, M., Dodson, P. M., Sheppard, M. C., Barnett, A. H., Franklyn, J. A. and Gough, S. C. 1998. Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class ii region of the major histocompatibility complex and graves' disease: Replication using a population case control and family-based study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 83(10): 3394-3397.
- Hosak, L. 2007. Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: A review. *European Psychiatry*. 22(5): 276-281.
- James, S. J., Melnyk, S., Jernigan, S., Cleves, M. A., Halsted, C. H., Wong, D. H., Cutler, P., Bock, K., Boris, M., Bradstreet, J. J., Baker, S. M. and Gaylor, D. W. 2006. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 141B(8): 947-956.
- Karayiorgou, M., Altemus, M., Galke, B. L., Goldman, D., Murphy, D. L., Ott, J. and Gogos, J. A. 1997. Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94(9): 4572-4575.
- Karayiorgou, M., Gogos, J. A., Galke, B. L., Jeffery, J. A., Nestadt, G., Wolyniec, P. S., Antonarakis, S. E., Kazazian, H. H., Housman, D. E., Driscoll, D. A. and Pulver, A. E. 1996. Genotype and phenotype analysis at the 22q11 schizophrenia susceptibility locus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 61: 835-843.
- Karayiorgou, M., Sobin, C., Blundell, M. L., Galke, B. L., Malinova, L., Goldberg, P., Ott, J. and Gogos, J. A. 1999. Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and maoa on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Biological Psychiatry*. 45(9): 1178-1189.
- Kumar, R. A., Karamohamed, S., Sudi, J., Conrad, D. F., Brune, C., Badner, J. A., Gilliam, T. C., Nowak, N. J., Cook, E. H., Jr., Dobyms, W. B. and Christian, S. L. 2008. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Human Molecular Genetics*. 17(4): 628-638.

- Le Couteur, A., Bailey, A., Goode, S., Pickles, A., Robertson, S., Gottesman, I. and Rutter, M. 1996. A broader phenotype of autism: The clinical spectrum in twins. *The Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 37(7): 785-801.
- Lee, S. G., Joo, Y., Kim, B., Chung, S., Kim, H. L., Lee, I., Choi, B., Kim, C. and Song, K. 2005. Association of Ala72Ser polymorphism with COMT enzyme activity and the risk of schizophrenia in Koreans. *Human Genetics*. 116(4): 319-328.
- Li, T., Ball, D., Zhao, J., Murray, R. M., Liu, X., Sham, P. C. and Collier, D. A. 2000. Family-based linkage disequilibrium mapping using SNP marker haplotypes: Application to a potential locus for schizophrenia at chromosome 22q11. *Molecular Psychiatry*. 5(4): 452.
- Mannisto, P. T. and Kaakkola, S. 1989. New selective COMT inhibitors: Useful adjuncts for Parkinson's disease? *Trends in Pharmacological Sciences*. 10(2): 54-56.
- Mannisto, P. T. and Kaakkola, S. 1999. Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological Reviews*. 51(4): 593-628.
- Meyer-Lindenberg, A., Nichols, T., Callicott, J. H., Ding, J., Kolachana, B., Buckholz, J., Mattay, V. S., Egan, M. and Weinberger, D. R. 2006. Impact of complex genetic variation in COMT on human brain function. *Molecular Psychiatry*. 11(9): 867-877.
- Marshall, C. 2010. Autism Chromosome Rearrangement Database. [http:// projects.tcag.ca/autism/](http://projects.tcag.ca/autism/) (accessed 02/12/10), part of Autism Related Breakpoints. [http:// projects.tcag.ca/cgi-bin/autism/tbrowse?source=autism&table=Autism&filter=&keyword=&show=table](http://projects.tcag.ca/cgi-bin/autism/tbrowse?source=autism&table=Autism&filter=&keyword=&show=table) (accessed 02/12/10).
- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M. and Hungerford, D. A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*. 20: 613-616.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2010. Gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 08/16/10), part of COMT catechol-O-methyltransferase [Homo sapiens]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312> (accessed 08/16/10).
- Niehaus, D. J., Kinnear, C. J., Corfield, V. A., Du Toit, P. L., Van Kradenburg, J., Moolman-Smook, J. C., Weyers, J. B., Potgieter, A., Seedat, S., Emsley, R. A.,

- Knowles, J. A., Brink, P. A. and Stein, D. J. 2001. Association between a catechol-O-methyltransferase polymorphism and obsessive-compulsive disorder in the afrikaner population. *Journal of Affective Disorders*. 65(1): 61-65.
- O'Brien, R. A., Semenuk, G., Coleman, M. and Spector, S. 1976. Catechol-O-methyltransferase activity in erythrocytes of children with autism. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 3(1): 9-14.
- Ogino, S., Gulley, M. L., Den Dunnen, J. T. and Wilson, R. B. 2007. Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: Practical and educational challenges. *Journal of Molecular Diagnostics*. 9(1): 1-6.
- Ozand, P., Al-Odaib, A., Merza, H. and Al Harbi, S. 2003. Autism: a Review. *Journal of Pediatric Neurology*. 1(2): 55-67.
- Palmatier, M. A., Pakstis, A. J., Speed, W., Paschou, P., Goldman, D., Odunsi, A., Okonofua, F., Kajuna, S., Karoma, N., Kungulilo, S., Grigorenko, E., Zhukova, O. V., Bonne-Tamir, B., Lu, R. B., Parnas, J., Kidd, J. R., Demille, M. M. and Kidd, K. K. 2004. COMT haplotypes suggest p2 promoter region relevance for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 9(9): 859-870.
- Poolsuppasit, S., Panyayong, B., Liknapichitkul, D., Serisathien, P. and Chutha, W. 2005. Holistic Care for Thai Autism. *Journal of Mental Health of Thailand*. 13(1): 10-16.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P. I., Daly, M. J. and Sham, P. C. 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*. 81(3): 559-575.
- Reddy, K. S. 2005. Cytogenetic abnormalities and fragile-x syndrome in autism spectrum disorder. *BioMed Central Medical Genetics*. 6: 3.
- Riva, S. and Kohane, I. S. 2004. SNPper. <http://snpper.chip.org/bio/snpper-enter> (accessed 08/16/10), part of SNP Finder. <http://snpper.chip.org/bio/show-sequence/?TYPE=U&GENE=15244 &CMD=relcids> (accessed 08/16/10).
- Rossi, E., Verri, A. P., Patricelli, M. G., Destefani, V., Ricca, I., Vetro, A., Ciccone, R., Giorda, R., Toniolo, D., Maraschio, P. and Zuffardi, O. 2008. A 12mb deletion at

- 7q33-q35 associated with autism spectrum disorders and primary amenorrhea. *European Journal of Medical Genetics*. 51(6): 631-638.
- Ruiz-Sanz, J. I., Aurrekoetxea, I., Ruiz Del Agua, A. and Ruiz-Larrea, M. B. 2007. Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 21(3): 202-207.
- Schindler, K. M., Richter, M. A., Kennedy, J. L., Pato, M. T. and Pato, C. N. 2000. Association between homozygosity at the COMT gene locus and obsessive compulsive disorder. *American Journal of Human Genetics*. 96(6): 721-724.
- Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*. 2(7731): 971-972.
- Shaffer, L.G. and Tommerup, N. 2009. An international System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009. Collaboration with Cytogenetic and Genome Research. New York.
- Sherr, E. H., Owen, R., Albertson, D. G., Pinkel, D., Cotter, P. D., Slavotinek, A. M., Hetts, S. W., Jeremy, R. J., Schilmoeller, G., Schilmoeller, K., Wakahiro, M. and Barkovich, A. J. 2005. Genomic microarray analysis identifies candidate loci in patients with corpus callosum anomalies. *Neurology*. 65(9): 1496-1498.
- Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisante-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R. D., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H. Y., Shinar, E., Beckmann, J. S., Yakir, B., Risch, N., Zak, N. B. and Darvasi, A. 2002. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *The American Journal of Human Genetics*. 71(6): 1296-1302.
- Simonoff, E., Bolton, P. and Rutter, M. 1996. Mental retardation: Genetic findings, clinical implications and research agenda. *The Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 37(3): 259-280.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*. 75(1): 304-306.
- Tenhunen, J., Salminen, M., Lundstrom, K., Kiviluoto, T., Savolainen, R. and Ulmanen, I. 1994. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene

- and its expression from two distinct promoters. *European Journal of Biochemistry*. 223(3): 1049-1059.
- Tenhunen, J. and Ulmanen, I. 1993. Production of rat soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase forms from bifunctional mRNAs. *Biochemical Journal*. 296(3): 595-600.
- Tilgmann, C. and Kalkkinen, N. 1991. Purification and partial sequence analysis of the soluble catechol-O-methyltransferase from human placenta: Comparison to the rat liver enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 174(2): 995-1002.
- Tilgmann, C., Melen, K., Lundstrom, K., Jalanko, A., Julkunen, I., Kalkkinen, N. and Ulmanen, I. 1992. Expression of recombinant soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase in eukaryotic cells and identification of the respective enzymes in rat brain. *European Journal of Biochemistry*. 207(2): 813-821.
- Ulmanen, I. and Lundstrom, K. 1991. Cell-free synthesis of rat and human catechol O-methyltransferase. Insertion of the membrane-bound form into microsomal membranes in vitro. *European Journal of Biochemistry*. 202(3): 1013-1020.
- Ulmanen, I., Peranen, J., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Karhunen, T., Panula, P., Bernasconi, L., Aubry, J. P. and Lundstrom, K. 1997. Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*. 243(1-2): 452-459.
- Verma, R. S., Dosik, H., Chowdhry, I. H. and Jhaveri, R. C. 1978. Ring chromosome 13 in a child with minor dysmorphic features. Irregular phenotypic expression of ring 13 syndrome. *American Journal of Diseases of Children*. 132(10): 1018-1021.
- Vincent, J. B., Herbrick, J. A., Gurling, H. M., Bolton, P. F., Roberts, W. and Scherer, S. W. 2000. Identification of a novel gene on chromosome 7q31 that is interrupted by a translocation breakpoint in an autistic individual. *The American Journal of Human Genetics*. 67(2): 510-514.
- Wassink, T. H., Piven, J. and Patil, S. R. 2001. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatric Genetics*. 11(2): 57-63.

- Weksberg, R., Stachon, A. C., Squire, J. A., Moldovan, L., Bayani, J., Meyn, S., Chow, E. and Bassett, A. S. 2007. Molecular characterization of deletion breakpoints in adults with 22q11 deletion syndrome. *Human Genetics*. 120(6): 837-845.
- Wolff, D. J., Clifton, K., Karr, C. and Charles, J. 2002. Pilot assessment of the subtelomeric regions of children with autism: Detection of a 2q deletion. *Genetics in Medicine*. 4(1): 10-14.
- Yirmiya, N., Pilowsky, T., Nemanov, L., Arbelle, S., Feinsilver, T., Fried, I. and Ebstein, R. P. 2001. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *American Journal of Human Genetics*. 105(4): 381-386.



ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก

รูปที่ 67 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *COMT* ที่ระบุตำแหน่งสนิปส์  
(สืบค้นเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2553)

<b>Official Full Name/Symbol</b>	Catechol-O-Methyltransferase Gene ( <i>COMT</i> )
<b>Gene ID</b>	1312
<b>Chromosome</b>	22; Location: 22q11.21
<b>Genomic</b>	NT_011519.10
<b>mRNA</b>	NM_000754.3
<b>Protein</b>	NP_000745.1

คำอธิบายรูปที่ 67 และ 68

- |  |  |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ลำดับนิวคลีโอไทด์สีเขียว</li> <li>2. ลำดับนิวคลีโอไทด์สีดำแถบเหลือง             <ul style="list-style-type: none"> <li>• ตัวพิมพ์เล็ก</li> <li>• ตัวพิมพ์ใหญ่</li> </ul> </li> <li>3. ลำดับนิวคลีโอไทด์สีส้ม             <ul style="list-style-type: none"> <li>• ตัวพิมพ์เล็ก</li> <li>• ตัวพิมพ์ใหญ่</li> </ul> </li> <li>4. ลำดับนิวคลีโอไทด์สีน้ำเงิน</li> <li>5. ลำดับนิวคลีโอไทด์สีดำแถบแดง</li> <li>6. ลำดับนิวคลีโอไทด์แถบสีน้ำเงิน</li> </ol> | <p>แทนนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5'UTR และ 3'UTR</p> <p>แทนนิวคลีโอไทด์บริเวณเอกซอน โดย</p> <p>แทนนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน</p> <p>แทนนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นโปรตีน</p> <p>แทนนิวคลีโอไทด์บริเวณอินทรอน โดย</p> <p>แทนนิวคลีโอไทด์ของอินทรอนบริเวณก่อน</p> <p>การแปลรหัสเป็นโปรตีน</p> <p>แทนนิวคลีโอไทด์ของอินทรอนบริเวณหลัง</p> <p>การแปลรหัสเป็นโปรตีน</p> <p>แทนตำแหน่งสนิปส์ของนิวคลีโอไทด์ ณ</p> <p>ตำแหน่งนั้น</p> <p>แทนนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสหยุดการ</p> <p>สังเคราะห์โปรตีน</p> <p>แทนไพร์เมอร์แต่ละเอกซอน</p> |
|--|--|

12345

1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890  
 -21,741 **tcagcaaggc cactgaggtgg tgactgcctc ccagaactct gttgggccac**  
**rs45478499 rs45521239**  
 -21,691 **cctccgtcct ggagaccccc aaaacctcca tagcaccaac tctgcccatt**  
 -21,641 **cacacacaca gtcagccctc cctcccagat ccaccgcggg cagagggcca**  
 -21,591 **gccaccatgc ctccatagc cgccatccct ggggaaggagc cctgaccccc**  
**rs79019435 rs45553733**  
 -21,541 **tccttacacc cctctacact cactgcctgt ggggagagct gctcgtctgc**  
**rs45604238**  
 -21,491 **acaagcatcc agggggctgg gtcgaggggc cccctgcatg gtgggggacc**  
**rs45551837 rs58097503**  
 -21,441 **atgttgctgt gcatggaatg aaactggcca cacataacag atatggtggc**  
**rs45535931**  
 -21,391 **gctctggtcg gatctagggg agtctgtcct acaggatgag gcttgaactg**  
 -21,341 **tcttgagtga ccagacacc agcctctgct tcgagtgtc agttatgatt**  
 -21,291 **attgtcctga tttagttaac tgttcttcag gggctccagg aggacgagt**  
**rs4646310**  
 -21,241 **tgtatcctcc cattgctctg tgcagcctct aacctctaga gtctaggggt**  
 -21,191 **ctgggggagaa gttgggaagt ctggccagtg gggccggtgc ctggtgacct**  
**rs2020917**  
 -21,141 **cgggaggtgg gatatcatca tcttcagaac tgtagttgtt actgggatac**  
**rs45559342**  
 -21,091 **cagctctggg agaccacagg tgcagtcagc acagcaggac cttagacaag**  
 -21,041 **gcaccagcc ccagtttccc cacctgggaa gggggctact tgtggctaga**  
**rs13306278 rs4646311**  
 -20,991 **agcagcccgg actcctgagc aagactagac caagaggccg gtatgtggac**  
 -20,941 **acccccgct gggcaccccc acggggagac cctggccacc gccgcgcgga**  
**rs45511293 rs45584533**  
 -20,891 **caccctcacg aggacacccc ggcccgcgcg acacctaccg cggggacgcc**  
**rs45536341**  
 -20,841 **ccgaccccat cctacctgct ggcgcccgcg ccgcgccccg cccccgcc**  
 -20,791 **gccacggcct gcgtccgcca ccggaaagc cctcctaata cccgcagcgc** **Exon1**  
**rs45581136 rs45593642**  
 -20,741 **caccgccatt gccgccatcg tcgtggggct tctggggcag ctagggtctg**  
**rs1805052**  
 -20,691 **ccgcccgcct gcctgcgccg gaccggggcg ggtccagtcc cgggcgggcc**  
 -20,641 **gtcgcgggag aggtgagagc gctggctaga ccggggccga atgcccggcg**  
**Intron 1**  
 -20,591 **attcggggcg ggggccttca gacctagggg ggaacactgg gataggggtg**  
 -20,541 **ggggaattcg gaccgctgtg aagtgatctg acgttgggtg ggaagtctccg**  
**rs45454096 rs3788319**  
 -20,491 **gacttggggg ggggaatctg gatgggaact ggggaattcg gaccttgggt**  
 -20,441 **gggatcttt ggaccggggg ggggtcccca gactccttgt ggaaagctga**  
 -20,391 **ggttgaagat ctgtgctgtg atgaggggct ccagatagcg gtgagagatc**  
 -20,341 **ccgcttcaag actgggttgg ggtccagac caggaggata agcctctccc**  
 -20,291 **tggagtaggg cttgacctgg tgagggtgtg gtagagtac aggggagggt**  
 -20,241 **cccacttggg ccttgggctg ggatcagact ctcagagctg gagagttgca**  
 -20,191 **ggaggcctgg gggagggtct gtggagcccc agactcagag ggccttgggt**  
**rs56901835**  
 -20,141 **acttctccaa caggctccct gttggaggcc ttgggttacc ccagggcctt**  
**rs3788320 rs3788321 rs60214071**  
 -20,091 **tcctgcaag agagaggctg ctccaccagc aaggggcca ggaactcccca**

**rs9306231**  
 -20,041 **gggtcggggg** gatgtgtggt gtgcaggacc acgtgggaat gttagagaaa  
**rs9306232 rs58155206 rs9306233**  
 -19,991 **ggggaagtca** ctccgggcct gccctgctaa cagacctgct ttttggattt  
 -19,941 **ttccagccag** **ggat**ttttgt gtctgttgc tttttattgt ttaaagtgac  
**rs737866 rs737865 rs57384068 rs12483960**  
 -19,891 **cctccaagcc** **tgagggaccg** taggagctgc **cctgcagagc** ccagtgagac  
**rs737864 rs57714936 rs5844401**  
 -19,841 **actagttaat** gcagaaaaaa cagattttac ttggtaacta ctgacaacat  
**rs12628871**  
 -19,791 **gagaaaaagc** tggctccatg ctgatttgtc tagatgtgcc tggagttaa  
**rs9332316**  
 -19,741 **agggagagtg** agggagtggg aaggggtggg gactcagtag agttagggaa  
 -19,691 **acagaaaatc** accaaaaactg ggaagggagg gttggccct gtgaaaccaa  
**rs9332317**  
 -19,641 **ctgatctggg** tttgccactg gggcttaccg aagtcaggcc cccaacctcc  
**rs9332318**  
 -19,591 **cacagagact** gggagacagg ggccccatcc tcaggtgttg gctggaacac  
 -19,541 **acaggaaatt** cttgtggcag ccttgaactt ctcaggcagg cactttagag  
 -19,491 **ggggctagga** tcgttctggg aatgtggcct tgagctgta ggagctatgt  
 -19,441 **tagtgttcgt** tccagcctag ataggccagg gtgaggccca gtggagaagg  
 -19,391 **ggactctaag** gagcctggct ggagtgtggg gagggagggt ctttgtcagc  
 -19,341 **actccccctg** tgcaagaaga gcagagacct gcttctttcc tctcaacagt  
 -19,291 **ccccgtccat** tttctgttct gtgttggttt cataaaactac cagcgggacc  
**rs73385647**  
 -19,241 **atctgttgag** acttggtagc aaaggatttt tgctggatga tgcaagcagt  
**rs45616631**  
 -19,191 **caagcattta** atgaggaaac aaaaataaca ggccaggcac agtggctcat  
**rs34663805**  
 -19,141 **gtctgtaatc** ccagcacttt tggaggccga ggaggatcac ttgaggccag  
 -19,091 **gagtttgaaa** caagcctggg caacataaag accccatctc tacaaaaaat  
 -19,041 **ttaaaaatta** gcccgctgtg **gtggc**atggg cctatagtcc cagctacttg  
**rs28673591 rs11703431**  
 -18,991 **ggaggctgag** gtgaaaagat cgtttgagcc tgggaggcgg aggctgccat  
**rs933269**  
 -18,941 **gagccatgat** cttgcctcta tactccagcc tgagcaacag agagccccta  
 -18,891 **tctttaaaaa** aaaaaaataa taataaata aaaaaataaa aagaaagaaa  
**rs933270**  
 -18,841 **gaaataaaaa** caaagatgaa tggagctggt gataaaccca gtttttgagc  
**rs71312726**  
 -18,791 **ctacagggca** gcagttgagg tttctggccg ttgggcccta acaaggccag  
 -18,741 **caggggcaact** cagggacttc ctgggtgtgtg gtgtgaagtc **tgtgatgatg**  
**rs34218527**  
 -18,691 **gcataggcat** tggatccca gttgtggta ctttctggag agagcatgtg  
**rs933271 rs36111598**  
 -18,641 **gcatgcagga** gctggagggg gggctctcct gggcggcctg tgtagcagca  
**rs34691071**  
 -18,591 **gctccaggca** caaaggctgc ccctggagaa tctgttgtgg ttctgagttc  
 -18,541 **tttcaagttt** atatcaagtt ttccggcttc agtctgcagg gctgtttttt  
 -18,491 **tcagatcctg** ggggcaaagg gcagctaaa gaccacctga gtcccaatag  
 -18,441 **ggatttgagt** tcttggtgac accaagtcag ggaggagaca aattagaaat  
 -18,391 **gtcagctctga** agagagtggg aggtagccag atactgaagg aaagtagatg  
**rs1544325**  
 -18,341 **ggaggatttg** gtaagggctg acgtgtagga aggcagtgac agtccaagtg  
 -18,291 **acaggcagat** cataaaacct caaggatagg ccgggcccgg tggctcatgc

-18,241 ctgtaatccc aagcacttcg ggaggccgag gtgggcaaat cacc**c**gagtc  
 rs6518593  
 -18,191 cagaagttcg agaccagcct ggctaacatg gcaaaaccct gtctctacta  
 rs34937293  
 -18,141 aaaatacaaa acattagccg ggc**g**tgggtgg **t**gcactcagg aggctgaggc  
 rs7291003 rs35558779  
 -18,091 gggataatcg cttgaa**c**gg gaggtggggg gctgcagtaa gccgagatcg  
 rs7287550  
 -18,041 caccactgca ctccagcctg ggcaacaaga gcgaaactcc atctcaaaaa  
 -17,991 agaattaggc **c**ggagcggg ggctcacgcc tgtaat**c**cca gcactttggg  
 rs35527466 rs12053782  
 -17,941 aggccgaggc ggggtgatca cgaggtcagg agatcgagac catcctggct  
 -17,891 aacacggtga aaccccatct ctactaaaaa tacaaaatta gccaggcgtg  
 -17,841 **g**tgg**c**gggca cctgtagtcc cagctacttg ggaggctgag gcaggagaat  
 rs34798238  
 -17,791 ggtgtgaa**c**c cgggaggtgg agcttgcaat gagccgagat cacaccactg  
 rs11913025  
 -17,741 cactccagcc tgggcgacac agcaagactg cgtctcaaaa acaaaacaaa  
 -17,691 acaaaacaaa acacctaca aagacagtga actagactag gatctgataa  
 -17,641 ctcccaaggg ggtgttatat ttctccactg aagcatagca tttctcttta  
 -17,591 caaaccttc ccttttgatt gaagataatc aaagtgagat tattcttatt  
 -17,541 taccaataa ttctggtctc attaaatttg gcctgattat ttacataaat  
 -17,491 gcagcacgaa cagtaattga ccacacaggc ctttttaagt ttgctgaaac  
 -17,441 ttttaatagg gaatcttaga ttgagctttt taaagccttt cgaggttagg  
 -17,391 aagccaagcc aagaacttcc aaccagactt cacctg**c**agt gtctatagat  
 rs9332319  
 -17,341 ttgggtgaat tcctctcttc tcgaggtccc tgaaatatcc caaggttcc  
 -17,291 gggccttaga accttgggat atttggaagt gactttcctt actcacatgt  
 -17,241 aagaccaaga accccgtaag ccacatacca ggccaaattt ttcaagagct  
 -17,191 ctttgtaagc aatggctcca caaagtcaac ctgaaagcca tctggtcata  
 -17,141 gctgattcta tgtgcatcat cctcaaacag gacattccag tccaaacctt  
 -17,091 ggtaatagaa ccagtgtttc caattgtgtc ctgttacaag gagaacagat  
 -17,041 tcttattgaa gttattcaat aactatattg ccatgaaaat agaatactca  
 rs8185002  
 -16,991 ataatagttt ctgatttttg gaggggtcag gccggaagaa aaagataatt  
 -16,941 gcttcaattt tgtttagaga agtatcattt actataatat tacgagtc  
 -16,891 tgataggtta agagaaaagg gaaaggtttc tttctttttt tcttttttga  
 -16,841 ggcagagtct cactctgttc cccaggctgg agtgcagtgg cgtgatctca  
 -16,791 gctcactgca agctcc**g**cct cctg**g**gttta caccattctc ctgcctcagc  
 rs9332321 rs9332322  
 -16,741 ctccc**g**agta gctgggacta caggtgcctg ccaccacgcc cgg**c**taattt  
 rs9332323 rs5748490  
 -16,691 tttgtgtttt tagtagagat ggggtttcac tgtgttagca aggatggtct  
 -16,641 **c**gctctccag acctcgtgat ccaccgcct cggcctcca aagtactggg  
 rs5993879  
 -16,591 attacaggcg tgagccaccg tgcccagccg gggaaagggt tcttttttta  
 -16,541 atattcagaa aataaaacat aaagagccaa caatattctg aacaaaagtc  
 -16,491 ataaaaagac tgtaatcadc cttcagcagt ttactcagtt gcatgcagg  
 -16,441 actgaattct tgttctgctt gatcttgggc tagcaggtag atgaacctat  
 -16,391 cttttctcaa ccagtggaga tcctggct**c**a gtgcagtcac gtgatctcaa  
 rs9332325  
 -16,341 agttaagaaa tgctgtcacg cccagggtgca gtggctcagg cctgtaatcc  
 -16,291 caacactttg ggaggcca**a**c gtggctatat cacttgaagt caggagtctg  
 rs174673  
 -16,241 agaccagctt ggccaacatg gtgaaaccct gtctctacca aaaaatacaa

-16,191 aaattagcca gttgtggtag cagacgcctg taatcccaac tactcggggag  
 rs9332327  
 -16,141 gctgaagtgg gagaatcgct tgaacccggg acatggaggt tgcatggagc  
 -16,091 caagatcacg ccactgcact ccagcctggg caacacagtg agactccatc  
 rs9332328  
 -16,041 tcaaaaaaag aaataaagaa atgctgtcag aagcctaccc catgggtacct  
 rs174674 rs174675  
 -15,991 gtcattggcc ttttcattgg tccctttttg ttgaagatga agcactttgc  
 -15,941 cctgtagctg attgcaagag atttcaggaa agcatcagag taaaactcta  
 -15,891 atgacaaaag acttaaaata gtgtagttaa atatctaata agagatcatt  
 -15,841 acaaaatcaa acgatttaca aggaatggtg gttgtttatg acacatagca  
 -15,791 ttttaataaa taaccagaat gatgattgct gttatatgag gacatgtcat  
 -15,741 tggcagaagg gtattcacca gtttgtggga actttataca atatctggaa  
 -15,691 tccttatatt aacatttaacc aatatgcatg taactcaagg aagtttaaat  
 rs11703069  
 -15,641 agcattaaaa aaaatttttt tttagttttt tttttttttt ttttttttga  
 rs174676  
 -15,591 gacagagtcc cactgtggtg ctcaggctgg agtgcatgag cacgatctcg  
 rs174677  
 -15,541 gtcactgca acctccgct cctgggctca agcgattctc ctgcctcagc  
 -15,491 cccccagta gctgggatta cagggtgca ccatcacacc cagctaattt  
 -15,441 ttgtattttt agtagagatg gggtttcgcc aactggcca ggctggtctt  
 rs174678  
 -15,391 gaactcctga ccccagggtga cctgcccacc ttggccttcc aaagtgttgg  
 -15,341 gattacagggc gtgagtcacc gcgtccggcc ctaaataaca ttttttattt  
 -15,291 gacagcacct tgcattgaaat tctgtagggc ccagccctac agggctctgtg  
 -15,241 ggtttttctc cccgtgtgca gagatgagag atcgtagaaa taagacaca  
 rs9606193 rs174679  
 -15,191 agacaaaagag atagaagaaa agacagctgg gcccggggac cactaccacc  
 rs35791904 rs35280052  
 -15,141 aagatgcgga gaccagtagt ggccccgaat gccaggctgc gctgttattt  
 rs5993880  
 -15,091 attggataca agacaagggg gcagggtaag gagtgtgagc tatctccagt  
 rs9332331 rs174680  
 -15,041 gacaggtaag gtcacatggg tcacgtgtcc actggacggg gcccttccc  
 -14,991 tgtttggcag ccgaggcggg cagcgagagg agacagctta tgtcattatt  
 rs9332332 rs9332333  
 -14,941 tctgtatttc agagacctt agtactttca ctaattttgt tactgctagt  
 rs9332334  
 -14,891 tagaaggcat agccaggtag aggggtggaac atgaaagcgg accaggagcg  
 -14,841 tgactgctta agcacagcat cacagggaga cggttaggcc tccggataac  
 -14,791 tgtgggcaaa cctgacactc cacaagagggt ggttgagcag agtcttctct  
 rs174681 rs12167215  
 -14,741 aactcccaca gggaaagggg gacttccttt cccggtctgc taagtaacgg  
 -14,691 gtgctttttc taggactga cgcaactgct agaccaaggc ccgctaagta  
 -14,641 acaggcgtct tcccaggcgc tgacgttacc actagaccaa ggagccctct  
 rs9332336  
 -14,591 agtggccctg tccgggcata acagaaggct cacacgcttg tcttctggtc  
 rs9332337 rs9332338  
 -14,541 acttctcacc gtgtcccttc agctcttata actgtatggc ctggtttctc  
 -14,491 ctaggttata attgtagagc gaagattatt ataattttgg aataaagagt  
 rs9332340 rs174682  
 -14,441 aattgctaca aactaatgat taacaatatt cataataaat catatctatg  
 rs9332342  
 -14,391 atctatatct aatgtaacta ttcttatttt atatattttc tttattatac

-14,341 **tggaacagct** cgtgcctcgt gtctcttgcc tcggcacctg ggcgacttgc  
**rs9332343**  
 -14,291 tgcccacaaa attcaccatt gaaataaacc taattagttt aacatctctc  
 -14,241 ttataaggtc acaggacaga tcctttgagg tcttccaggg gccctccagg  
 -14,191 aaatctcaag tcagtctgag atcaagacaa tgtcacaggc cacatgcagt  
 -14,141 **ggttcacgcc** tataatccca acactttggg agtccgagga gggaggac**tc**  
**rs174683**  
 -14,091 **cttgagccca** ggagtttgag accagc**ctga** gaaacatgct gaggccctgt  
**rs5992498**  
 -14,041 **ctctacaaaa** caaaa**g**ttg aaaaattagc tgggcatggt ggtacatgct  
**rs174684**  
 -13,991 **tgtagtccca** tgtactctga agactgaggc **gggaggatca** cttgagccca  
**rs72554680 rs72547447**  
 -13,941 **ggagttcaag** gttgcagtga gctgtaattg caccactgca ctccagcctc  
 -13,891 agtaacagag tgagactctg tcaactaaaa aaatttaggc tgggtgcagc  
 -13,841 **ggctcacgcc** tataatccca gcattttggg aggtcaaggt ggacagatca  
**rs9606194**  
 -13,791 **cctgagatca** ggagttcaag accaggctgg ccaacatggc aaaaccccc**c**  
**rs174685**  
 -13,741 **ctgtactaaa** aatacaaaaa ttagctgggc **gtggtgccat** gtgcctgtgg  
**rs5993881**  
 -13,691 **tcccagctac** ttgggaggct gagacagcag aattgcttaa gcctgggagg  
 -13,641 **cagaggttac** agtgagccca gatcacacca tggcactcca gcctgggtaa  
 -13,591 **cagagcgaga** ctctgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa **aaaat**ttaaa  
**rs28600912**  
 -13,541 **gaaactttat** acataaatcc attcaatgat tatgaggatca attctagcca  
 -13,491 **gctttgacct** cataacataa aatttctttt ctgcagactt tcttgaggcc  
 -13,441 **aggagttcaa** gaccagcctg ggaaacatag ggataacttt ctgtatccat  
 -13,391 **tcacagttgc** tttgttttg agacagaatc tcagtctgtc acccaggatg  
 -13,341 **gagtgcagtg** gtgagatctc agcttactgc agccttgacc tcctgggctc  
 -13,291 **aagcgatcct** cctgcctcac cctcccaagt agctgggact acaggcatgt  
 -13,241 **accaccatgc** caggctaata atttttgagt ttttttatag aaacagggtt  
 -13,191 **tcatcatggt** **tcc**aggctt gtctcgaatt cctgggccat tcaggctttg  
**rs73385665**  
 -13,141 **tcccatat**ttt ttctctttt tgtaatttta cttcaggaca aaattacatc  
 -13,091 **cctttcttta** acaaaaacac tctacattct ttgcatactt ttcataataa  
 -13,041 **aacacatcct** atcttctctc cactctttgt ataggaaatt gtttccctca  
 -12,991 **ttcttattgt** ttctaggagt tttgttttca tatattgatt ataattttta  
 -12,941 **accattagta** accggtatttt tttttttaa gagacagcgt cttgctcttt  
 -12,891 **tgcccaggct** ggagtgcagt ggcacaatca ggactcactg cacccttgaa  
 -12,841 **ctcccgggct** caagtaattc tccaacctca gccccctaaa gcactgagat  
 -12,791 **tacaggcatg** agtcaccacg cccggccata acttgatattt tacaagtaaa  
 -12,741 **actgggaaga** agacaattgg aaattgtctg tcatttacca gtttggtggc  
 -12,691 **aaat**tttatg aatataccat cttataatct ctagaggtat atccttttta  
 -12,641 **tagtacaatg** tttttaagtg ccaagtacat gtttattaac agaccagaat  
 -12,591 **acct**ttagcc agtctgtacc atataaaaat aagaagccaa aaagtaca**aa**  
**rs72556506**  
 -12,541 **aagttacgct** taataatgaa tg**ttt**cagca ctttcttctc ttcaggatt  
**rs5993882**  
 -12,491 **at**ttagatat tcaatgaatg tctattatttt aacttcactt agtatgactc  
 -12,441 **tgagg**ttgaa agttactgaa aacatctt**gt** aagct**tt**ttt **agg**ccaatt  
**rs5993883 rs35014456 rs35777291**  
 -12,391 **attat**caaac gcaattaaca aaacacaact cactagttta **tata**agag**ct**  
**rs11089323 rs12170804**  
 -12,341 **ag**ttctcact ttttttttta ctctatttta tatatttttt cttttctttt

-12,291 cttttctttt tttttttttt ttttttttct gtagagacaa ggtcttgctg  
 rs5993884 rs11703339 rs11703340 rs9606195  
 -12,241 tgttgcccag gctggctctg aactcctagc ctcaagtgat ccacttacct  
 -12,191 tggcctccca aagtgctggg attacaggtg tgagccacca cccagccta  
 rs9617852  
 -12,141 ttttatatatt ttatctgaac tgtgtttctg gcaaattgga caagttaagg  
 -12,091 gtcacttgct ccatgtgagg ggaaggcttt ctacctgtat ttgtggataa  
 -12,041 gacctttacg acttgttttg ccctgatgga tgactacatg tttccagtga  
 -11,991 gctcagctgg ttgctttttg gggccctga ggcaactgca gccctgatg  
 -11,941 gggcaggaag cctaaagttc cagggaccgt ggggagttga gggctggag  
 -11,891 ggggaagaga gaggcctgca gcggggatcc acaggtggag gaggccagac  
 -11,841 ttgaaggggg tgtctccttc aagagaaagt agggaagtat ggaggtgata  
 -11,791 ggaaggggaga ggccctgagag gagctagttt ggggagatct caagtatccc  
 -11,741 aaaggagcca ctgatgttcc aaattatcct tggtaaagtc acatcaacaa  
 -11,691 ggaaggaagc agacagaggc gcacttgttc cttgcagttt tgttttgatg  
 -11,641 tgctgattaa agtagcgcag agggcatgat cagcagggct ccagtaagac  
 -11,591 gctcccacgg gaggagcaag aacacagaac agagggggca agacagctcc  
 -11,541 accaggagtc aggagtgaat cccctctggg aacgaggcac taggaagaag  
 -11,491 aacttccagc ccaggaggta ggtagcgttc agaagaagcc tggggcgggc  
 -11,441 gcgggtggcg acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcgggcg  
 -11,391 aatcacgagg tcaggagatc aagaccatcc tggctaaccac ggtgaaaccc  
 -11,341 catctctact aaaaatacaa aaaattagcc gggcgttgtg gtgggcacct  
 rs174686  
 -11,291 atagtcccag ctacttggga ggctgaggca ggagaatggc atgaaccgg  
 rs73385671  
 -11,241 gggacggagc ttgcaatgag ccgagattat gccactgcac tccagcctgg  
 rs174687  
 -11,191 gcgacagagc aagactctgt cccaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagcctggga  
 rs73385673 rs174688 rs2004497  
 -11,141 ctcttagcgc ctccagagcct tactcagaat cataaaatca ttagaagcaa  
 -11,091 tgtctgtcct cactgctgca tccgatattc ttccggacca ctggatcaca  
 -11,041 aatcaaacca tgtgactccc gcatgagcag gcagagtgga gataacacgg  
 -10,991 atcgtgtgt acactgtgtg ctccggttgt tgcatccgag ggttgatcgg  
 rs739368  
 -10,941 atggtgggtc ccatccagat ccaagtcctg gccctgatc acagagaaac  
 -10,891 acagctggac attaaagtgg tgaggacgga aattataata tttggtgacc  
 -10,841 agtgacagga ggggagagag ccgagctccg ctccgagttg tgcaaagaag  
 -10,791 tggggagtgg ggaggaagaa cagtggggac tcagtggagt gaggaaagtg  
 -10,741 gaaaattacc aaaagcagga agggaggggtt agccttggga aaccatctg  
 rs174689  
 -10,691 ggtttgccac gggggcttac tgaagtcagg cccccagtcc cacagaggct  
 -10,641 gggagacagg ggccccatct tcaagtgttg gccagaacac aggaaattct  
 rs174690  
 -10,591 cttggtagcc atgactttct caggcaggcg ctttgaaggg ggctgggatc  
 -10,541 attttaggaa tgtggccttg agctgttaga agccatgtgc agtatggctt  
 -10,491 acacctgtaa tcccagcact ttgggaggct gaggctggag aatcacttga  
 -10,441 ggccaggagt ttaagaccag cctgggcaac atagcaagac gctgtctcta  
 rs174691  
 -10,391 caaaaataat ttttaaaaaa ttagccaggc actcggcat gccctgtgt  
 rs72549225  
 -10,341 agtcccagtt actcaggagg ctgaagcagg aggactgctg gagcccaaga  
 -10,291 gttcaagggt gcagcaagct gattgcacca ctgcactcca gcctgggagg  
 -10,241 cagaggtgat cacgccactg cactcccgcg tgggagacag agcaagacc  
 -10,191 tgtctttaa aacaaaaagg ccaggcaggt gcggtggctc atgcctgtaa  
 rs9605040



-10,141 tcccagcact ttgggaggcc aaggcgggcg gatcatgagg tcaggagatc  
 -10,091 gagaccatcc tggctaacat ggtgaaaccc cgtctctacc aaaaacacaa  
 -10,041 aaaagttagc cgggcgtggt ggcgggccc tgtagtccca gctactggga  
**rs174692 rs5993886**  
 -9,991 ggctgaggca ggagaatgcc atgaacccgg gggatggagc ttgcagtgag  
 -9,941 ccgagattgc gccactgcac tctagcctgg gagacagagc aagactccgt  
 -9,891 ctcaaaaaca aacaaaacaa caaacaaaaaaa aaaaacagccg agcgcagtgg  
**rs28804429**  
 -9,841 ctcaagcctg taatcccagc actttgggag gccgaggtgg gcagatcaca  
 -9,791 aggtcaggag ttcaagacca gcctgacca catggtgaaa ccttgtctct  
 -9,741 actaaaaata caaaaattag ctaggcgtgg tggtgtgagc ctataatccc  
 -9,691 agtactcag gaggctgag caggagaatc gcttgaaccc aggagcgga  
 -9,641 ggttgacagc agccgagatc gcgccactgc actccagtct gtgtgacaga  
 -9,591 gtgacagccc gtctcaaaaa ataaataaat aaataaataa ataaataaat  
 -9,541 aaataaataa ataaataaat aaaatgaagc agcagcagct ttgttagtgt  
 -9,491 ttgttcaagg cctgataggc caaggtgagg ctcagccgag aaacgtgctc  
**rs35788262**  
 -9,441 agaggagcct ggccggagtg tgatggggga gtctttgtcc aggctgctgc  
**rs11704299**  
 -9,391 cacgggtggc ctcaggactc atggcctggg cgctgggggt ggggctgcca  
**rs5993887**  
 -9,341 ctcagccttg aggagagcaa tgaggaggtc agattccact cacatccagt  
 -9,291 gcggtctgga tgcaggcctg gccagagacc tggtccagat gctggggctt  
 -9,241 tgtttttttg ttgtttttt tttgagacag agtctcctc tgttgccag  
 -9,191 gctggagtgc agtggcacta tctccactca ctgcaacaac ctccacctcc  
 -9,141 acggttcaag cgattctcct gcctcagcct cccgagtagc tgggactaca  
 -9,091 ggcacccgcc accatgcccg gctcattttt tgcattttta gtggaacag  
**rs165879**  
 -9,041 agtttcacca tgttggccag gatggtctcc aactccagac cttgtgatct  
 -8,991 gcctgcctca gcctccaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccactgca  
 -8,941 cccagccggc tttgtttaca gtactcagca gctgcaaaaa tagtccccat  
 -8,891 tcccaggcag ggcaggctcc cgggctcagt ccagcggggc agatggccag  
 -8,841 cctgcacgtc accccactag gcatgtccag gccctttctg cccctcccta  
 -8,791 aaggcaccoc tgcctttct gtccctcca cactgagcca agccagcctc  
 -8,741 cactcttgcc ccaggcctgc cctctgctgg gagccgggac actgagctcc  
 -8,691 tgccacatga gcaggttgac ctgcaggggg cctccaagca ggtgccaagg  
 -8,641 cagaatcgga tgtgaccagg agaacaccct tgaaggataa agcgaatgtg  
 -8,591 cgaccaccat gcaggctcgg cccatggaag ggaggggagg gggccccgac  
**rs28621910 rs3819619 rs3087869**  
 -8,541 ggggccacag taaaggagtg gagggggccc acaggcaggg atggcccagc  
**rs1055503**  
 -8,491 tggcccccctg gggctgtgaa tctgcaggtg cagtgcagcc tcttgccctc  
 -8,441 ctcagcccag cccttgcatc tgcccttggt tgtgtctgtg aagacaaaagt  
 -8,391 caccgtggtc cctgcagcac ctggcttgaa gcagggtgtg agtccgtgtg  
 -8,341 aaagccttcc ctttagctat taggtattga gtcaaaaaaa aaaaaagcct  
 -8,291 tcccctgagc ctgggggcct ggccccactg aggataccag gcgggggagg  
**rs5992499**  
 -8,241 ctacaggagg ctgccctctg cctggccatc tgaccttcca ttctgacccc  
 -8,191 ttcccttcca caccagcccc tttccctatg tagggtgagc tctttgttgc  
 -8,141 aactgctcac ctctgccatg gtcggatgag agcagccacg gacaatgtct  
**rs5992500**  
 -8,091 gtgcaattgt gcgttttttg ttttgttttg ttttgagatg gactcccact  
 -8,041 cttgttgcgc aggttgaggt gtaatggcac catctcggct cactgcaacc  
**rs9332344**  
 -7,991 tccacctccc gagttctagc gattctcctg cctcagcctc ccaagtagct

-7,941 gggattacag gcatgcatca ccatgtctgg ctaattgtgt atttttaata  
 -7,891 gagactgggg tttcaccatg ttggtcaggc tgttcttgaa ctctgacct  
 rs3819621 rs9332346  
 -7,841 caggtgatcc accgcctca gcctcccaa atgctgggat tacagacgtg  
 -7,791 agccaccgtg cctggttgat tgtgcgttct gataaagctt catttacaga  
 -7,741 aatagcaggt aggccctcg cagggtgccc agagcaggtg cactgtctca  
 -7,691 cctctctca ggtgtcaccg gggtgagagg ctagtctct gctctctct  
 -7,641 tcctctctgc aggttgaga aatgacagct tcttgactg ggggttatga  
 -7,591 gacagtggca ggagggggac actccagag tgctgccaga aagaggcgag  
 rs9332347  
 -7,541 gccccatctg gatttgatgg catttttatt gtggtgtgt tttagagaca  
 rs34966851  
 -7,491 gtgtctgtcg cccaggatgg acgacatgg gcaatcatgg ctactccag  
 -7,441 cctccaactc ctgggcccac gcaatcctcc cacttcagcc tcctgagtag  
 rs34300220  
 -7,391 ctgcagctat aggcacacca ccatgcctgg ctcaatgggt attttgtggc  
 rs7290221  
 -7,341 cattaactt ctggtcattc ctttagattc ccagaggctg gatggaggtg  
 -7,291 agtggccagc cctgggtcc agagatgagc gcggggcctg gctgcagct  
 rs5992501  
 -7,241 gtggggtctc ccaggctggc ctccagggtg cctctcagcc tgtccacagg  
 -7,191 cgctgcccac gcgtgtggcc tacctgggtg tgcttgccct gtctctacgc  
 -7,141 acctgtactg gctctccctg gattactgga tcgcagtga atcccctgcc  
 -7,091 agaatcctgg tcccccttta tcacacggga tcagccccaagg gggcagggc  
 rs9332348 rs5746849  
 -7,041 ttcttgagc agttccagcc tttgctgggg gtttccagcc ctggtgagca  
 rs9332349  
 -6,991 agccccaggt agggccctct gcagccccg tgggggacct gtgtgccag  
 -6,941 cagagctgcc ccgtgtgtaa acgcttagaa ctggcctct tcctgccatc  
 rs9332350  
 -6,891 tgtgtcctgt ttgtcatcac gcctgtggct ctatgctgt ctccccgact  
 -6,841 gggccaccag ccctgtgagg gcaggatgag gcacgtccaa gccacagtgg  
 rs9332351  
 -6,791 ctctcagtgt gcagggtgct gttagcattg gttctgtgt ctggaatagt  
 -6,741 gagaacagtg tgccccaat ggccagtggc ctttccgagg gtcactgcag  
 -6,691 ccgcatgttg gccctctgtg gagaacggag gatgcacagc catttcagag  
 rs9332354 rs9332355  
 -6,641 cacaacctga ggtctcctga gcttgctgtg cagcccagtc tttctctccg  
 rs9332356 rs9332357  
 -6,591 tggcccctgg tagctgtctt tctcccagga ggaggagaaa gacaccttc  
 -6,541 tgagcaggag gatgtgggtg aatagagacc aaagtgtcaa tcaactctct  
 -6,491 gacagagggt atagcagaat gaaaaactga tggaccccag atctttgcaa  
 -6,441 agagaacaaa gtcagttct agttatctt ctttctttt tttcttttt  
 rs8140865  
 -6,391 tcttttttt ttttttttt tttttttgag atggagtctc gctctgctgc  
 rs8136901 rs9680656  
 -6,341 ccaggctgga gtgcagtgg gtgatctcag ctactgcaa ccgctccc  
 -6,291 ggttcaagtg attctctgc ctacgctcc tgagtaacca ggactacagg  
 -6,241 cacacaccac cacgcccagc taattttgt tatttttagc agagacaggg  
 -6,191 tttcaccatg ttggccagga tggctctgag ctctctttt ttttttttt  
 rs13054814  
 -6,141 ttttttttg agacggagtc tcgctctgtc acccaggctg gactgcaatg  
 -6,091 gactgatctt agctccctgc aacctctgcc tcccaggttc aggcattct  
 rs12167365  
 -6,041 cctgcctcag cctcctgagt agctgggact aacaggctgct tgccaccaag

## rs12168881

-5,991 cctggctaata ttttgtatatt ttagtagaga cagggtttca ccatattggc

## rs57405867

-5,941 caggctgatac tcgaaatcct gaccttgtgg tctgccccgcc ttggcctccc

-5,891 aaagtgctgg gattacagggc gtaagccacc acaccaggcc cattttctag

-5,841 ttatctttta cggattttttt aaaatgagcc tagaaaccag gtcatataat

-5,791 tagtttattt ttttaattct tatagagaca gggcttact atgttgccca

-5,741 gagtggctct gaacgcctgg gctcaagtga tcctcctgcc tcagcctccc

-5,691 aaagtattgg gattacaggt gtggccactg ttccagccat agttcatatt

-5,641 ttaaaggatt ttttaagatc tcatttctact gatgttactt gcagtatatt

-5,591 tatggaaaac attcctgtct tttttttttt tttgagacgg agtctcactc

-5,541 tgttaccag gctggagtgc agtggcgtga tctcggctca ctgcaagctc

-5,491 cgctctggg gttcacgcca ttctcctgcc tcagcctccc gtagctgg

## rs165767

-5,441 gactacaggt gcctgccacc acaccgggcc aattttttgt attttttagta

-5,391 gagacagggg ttcactgtgt tagccaggat ggtctcgatc tcctgacctc

-5,341 gtgatctgcc cgcccgggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcattgagc

## rs5993888

-5,291 caccgcgccc gggcagcatt cctgtctttt aaagaaagat gagaccagat

-5,241 gcagtgggtg gcacctgtgg tcccagctac tcaggaggat gccttgagcc

-5,191 tgggagttca aggctgcagc tgcagtgagc cttgatcacg ccaactgcact

-5,141 ccagcctggg caattgaaca ggaccctgtc tctaaagaaa taaaataaag

-5,091 gcagatgaat gtcacttagg gtgtgtccaa tgtgagagag aatactgacc

-5,041 aggtgacaga ggtgatggac tctctagctc tgcagcagac tgcctggcag

-4,991 agaagcttgg gcaggcctgg cactgaggcc cagaagcttc atgctcttta

-4,941 gagccagagg tgtcaagccc agctgcctgt gtcctggccg cactgtgagg

-4,891 cactgaggat gccctcacac gtgcatctgc atgtggcgtg catgtggcaa

## rs740603

-4,841 gcatgtgcag gtgctgtgtg ggcacgatca tgcttgcct ctactgtgct

-4,791 ggagaggtaa gaccatcagc cgtttcacag aggagggaaat gtggacctca

-4,741 cgggggtctc atgagcttgc gagccgatgg ccaggcagcc ggtgcagaag

## rs71312727 rs16982842

-4,691 gttcatccat tttgatgaac cgtgaattca tctgtacttt attcattttta

-4,641 ataactgaat catacctcat tgtatggctc taccatgttt tattatccat

-4,591 tcagggtgcta acggatggaa gggttgtttc tacctgttgg ccattgtgga

-4,541 tgatgttgct atgcatattg gggtagcagt atctggttta gtccctgttt

-4,491 tcaattcttg gtatacacct aggagtagaa ttgctgggtc atatggtagt

-4,441 tctattttta ctttttttta tttttaattt ttgtgggttt ttaagaattt

-4,391 tttaatattt gtgggtgcat agcatgttta attttttttt tttttttgag

-4,341 acggggtctt gctctgttgc ccaggctgga gtgcagtggc aggatcacag

-4,291 ccctgtgcag cctcaacctc ctgggctcag gtgatcctcc cgctcagcc

-4,241 tcccaagtat ctgggactac acgtgcggac caccacgcct ggctaatttt

-4,191 taagtttttt gtagagatgg ggtcttgcca tgtttccag actggtatgg

-4,141 gactcctggg ctcaagcaat cctcccatcc caacctcca aagtgcctgga

-4,091 attacagtca tgagccacca ggtctgacca catgtttaac tttttgaaga

-4,041 actaccaaac tgttttccac ggcattcaca ccagcaatgc aagagggttc

-3,991 ccatttcatc acatccttgc taacacttgt tattttcctt aaaaaaaaaa

-3,941 aaaaaaaaaa gccagctggg cacgggtggct catgcatgta atcccagcac

-3,891 tttggaaggc caagggggtg gagcacttga gctcaggaga ctagcctggg

-3,841 caaaatattc agaccccacc tccactccat ctctaccaa aaaaaaaaaa

-3,791 aaaaaaagct ggggtgtcgg tgggtgcacat ctgtcgtccc agctacttgg

-3,741 gggggctgag gcaggaggat cccttgagcc caggaggtcg agactgcagt

-3,691 gagctgcgac cgcgccactg cactccaggc tgagcgacag agtgagacct

-3,641 tgtttcaaaa aaacaaaaaa aaagcacatt tcaaacatac aaaaaagcag

-3,591 agagaattcc cctcggctct ccggcctgca ccccaccgcc ccccaccaca

-3,541 ggggcattca aaactgtcctt tttgcctctc tgtaaggtaa ggggggactc  
 -3,491 ttgacgctcc ccagaccaca cagccaaagt agggcgatcg gatcataggg  
 -3,441 ggtcccaggt cggacactga gctggcgtgc cactctcga gtcctgggac  
 -3,391 cccaaactaa aggagctggt ccttttcccc atggagggct gacggggcaa  
 -3,341 aatcccaggg ctgggaacat ccgagcagct ttgagtagca caggtggggt  
 -3,291 tctacgtggc tttctttaa gggaggcctg attctcggct tttcaggacc  
 -3,241 cgccctccat tttctcactt gcctgctctt tcgtcctcgc aaactgggca  
 -3,191 gtggccggtg acagcgcagg gtcagccctc ggatggccaag gtgggcgtga  
**rs56104268**  
 -3,141 tcccaccctc ctccgtggct ggggtggcgt ggtcccaaag tcaattggat  
 -3,091 gtggctccgc gtccctccc gcccagtggg cggggcctcc ccttctgggg  
 -3,041 cctcccatcc cacaccagcg agcagagagg aggggtggcg gggaggccct  
 -2,991 acggggctgg ggcggggcgg agcggaggtg gttagctgtc gggagggtgg  
 -2,941 gtgggcaggg gccagggctc tgttgggtgg ccggggcagc cagtccctct  
 -2,891 gctcagggtc tcagttcaca ctcaaaagg aatcccagcg ctcttctcct  
 -2,841 ctggcggttg ctggagggcc ttgtgaggtg gccgtgggca ctgtagcccc  
 -2,791 caggcactgc attgtggcct gggcgtggtg gcctttgagc ctttggcctt  
 -2,741 gagcacttcc ccatacccca tggctcttgg ccggttggggc ccagttggcc  
**rs11912495 rs11912353 rs11912354**  
 -2,691 gcagagcctt tggccttgag cacttcccca gccccatgg ctcttggcca  
**rs174693 rs9606196**  
 -2,641 ttggacccca gttggccaca gagccgcggg caggtgggac aggcggggcac  
 -2,591 tgggtgcctc cttgcaccag ccaggcccag cctgcagagt ggagtgggcc  
**rs174695**  
 -2,541 ggtccctcct gccaggcaaa ggaagggggc ttcgggcccc tccttctgtt  
 -2,491 ggccctcctc cctctgctgc ctcccactag gccctgggag aacttgctgt  
 -2,441 cagatttatg aacagacaga cctagagatt agagattcaa aagccaaatt  
 -2,391 cttacacaat tcaagtatta acgcagattt ggatttataa tttgggactc  
 -2,341 caaggtctac caagtaattt gctgtttcag aatagccctt ttaatttggg  
 -2,291 gtatatattt ctaaacactgt tttttaaata tggagagtaa acaaaatggc  
**rs73880029**  
 -2,241 ccattatctg accacacaaa tactagtagt cattatagat aaacctatagc  
 -2,191 agataaataa tagtaaaaa agcaacaggc tgtgtcatag gaaatcccca  
 -2,141 ccatgaagaa aggagcaagg tggaaagttc tggctgcttc aggtctgcat  
**rs16982844**  
 -2,091 ggtccctctc caccatgggt cccctgtca tcttctgcc agaataagga  
 -2,041 cactgtcctt aggggaagcac catctcttgt tttttcccca cgagccctgt  
 -1,991 gggatcatgg acgtcctgcc ccgctgggaa acacagtggg ccacgggttt  
 -1,941 ccctgcaggc ctgggaccct tcccagggt agcagcagaa ggcagcacga  
 -1,891 ttcccactcc tgcagctgtg gacaggggca ccccactgt cactgagccc  
 -1,841 tgcaccgggt tccatcacct gctcggggct ctggcctttg gccttttctt  
 -1,791 gtgagctgca tgttggccac tgtgacctat ctgtctcctc atcttttctt  
**rs35617967**  
 -1,741 tactggtttg tgtatgttct tggtaaaacta gcccttggtc ttacacatca  
**rs4646312**  
 -1,691 tttccaaggt actaaggact cttcagggga aatacaactt gagcagagtg  
 -1,641 gttccctcct cttgtgggtc acaagggtgca ggtgcacaca cacatagccc  
 -1,591 acagggcaggt gtggacaggg accaggagac tgcccctggg gtccttggct  
 -1,541 gggggacact agtagggatg tcccttggcc tctctgaggc cttctgctgt  
 -1,491 ctcttctgag gccgaaaagg cgaagcactg ccctcgcctt gctaggggaag  
**rs34450201 rs13306280**  
 -1,441 gctcaggcca ggctggccct atccggggaa ggggctcagg tatctggacc  
 -1,391 ttggatcatg ccagggttagg gtttatgttg atgattatcc aaaggcaaaa  
**rs35919169**

-1,341 ttgatttcca cagaaataac atctgctttg ctgccgagct cagaggagac Exon2  
 rs11569715 rs5748492  
 -1,291 cccagacccc tcccgcagcc agagggctgg agcctgctca gaggtgcttt  
 -1,241 gaaggtgagt tggccaacgg aagccggggc agtgccaagg tgggtacaga  
 Intron 2 rs35357972 rs34686565 rs9332358  
 -1,191 ttccggcccc gtgcatgggc acaggtctgc tgagcacatg tccactctgc  
 rs165656  
 -1,141 ctgtgtaaat aggccacatg gcctgaaatc ccctagaagc ctggtgtccg  
 -1,091 catgacctcc ccctagggcg gagcctctgc ttcctgttcc tcttctgctc  
 rs9332360 rs9332361  
 -1,041 tgtcctctgg tgccctgagg ctggcctcca ggggtgtccc ctctgtggcc  
 rs165722  
 -991 ctaggcctgc ctctctgcct ggggtgtgct tctctaaaatg gagcgtccag  
 rs9332362  
 -941 cagagagtgg gatctcctat gccactggga gccacgggcc ccatcccaga  
 -891 aagacctctg agtgagcaca ggggccctag aagaagtctc cttgtgtcct  
 -841 tcccgtttta gggctctgta cctgaacccc tgggcttctg cctcaggcct  
 rs11569720  
 -791 cctgtgctct gctctctgcc tgctgggtcc cctcaccagg cttctgtctg  
 -741 gttcccaggc tacctgcctg gagggtcaca ccaggaggat ttcaaacagg  
 rs11569718  
 -691 tttcaagtgg ggtcacttgc catcactgtg cccacagagg tacactgttg  
 -641 tggggcggcag ggctggcctt tctcatctgg gacatgccac gttgctgttc  
 rs11569719 rs9332363  
 -591 ccaaggggag tggtgagtgg gtctgtcctg gtgtgcctgg cctggggact  
 -541 gccagtgtcc ttacttggac actcaatgaa aaggccacat gaatccctgg  
 -491 ggcgtccaga gcatgggtga ccagcacggg ctcaccacat gaggccaagg  
 -441 ggctgcacca tacagcctct cctttggcca cccgtgacta cccccaactc  
 rs3810595  
 -391 cggggccatgg ggcttcccta cccctgggtg tctctaaagc cagctgggag  
 rs11569717  
 -341 acaacagcct gagtccgtgt ctgcttctgt attttgtgtg gttttagagg  
 rs11569716  
 -291 atccctgggc tgcttgggga agcaccagc gccagggagt gtgacctgc  
 -241 aggctccaca caggactgcc agaggcacac acctgctctg tctaccagc  
 -191 ggcaccagag ggcacgagaa ggctggctcc ctggcgctga cacgtcaggc  
 rs6268  
 -141 aactgaggca caaggctggc atttctgaac cttgcccctc tgcAACACA  
 rs6269  
 -91 agggggcgat ggtggcactc caagcaaagg ggcgtgtggg tgctgcagga  
 -41 ggagcacaga gcaactggcg ccctcccctc ccgccctgca gATGCCGGAG Exon3  
 rs72563160  
 +10 GCCCCGCCCTC TGCTGTTGGC AGCTGTGTTG CTGGGCCTGG TGCTGCTGGT  
 rs11544670  
 +60 GGTGCTGCTG CTGCTTCTGA GGCCTGGGG CTGGGCCTG TGCCTTATCG  
 rs6270  
 +110 GCTGGAACGA GTTCATCCTG CAGCCCATCC ACAACCTGCT CATGGGTGAC  
 rs75012854 rs74745580 rs72549343  
 +160 ACCAAGGAGC AGCGCATCCT GAACCACTG CTGCAGCATG CGGAGCCCGG  
 rs4633  
 +210 GAAACGACAG AGCGTGCTGG AGGCCATTGA CACCTACTGC GAGCAGAAGG  
 rs76384862 rs6267 rs740602  
 +260 AGTGGGCCAT GAACGTGGGC GACAAGAAAG GTGGGGTCCG GGCCAGCAGG  
 rs13306281rs76452330 Intron 3 rs3218737  
 +310 TGCTCAGCTC TGGGACAGGG ACCCAGGACC AGGCATCAA GCCCTTACAG

**rs34819182**  
 +360 GAGAAGCTGT TATCACCCCA TTTCAGGGG GCTGGGAACC CTGGGATATG  
**rs2239393**  
 +410 CCCAGATAGG GCTGGGGGGC TCCTCTGGAG TCCCAGGGTG CCAGGGTCCC  
**rs34234839**  
 +460 TGATGACCCC TGCAGGCCCT GCTGCCTGCT GCCCCAGGAC AACAGGCCCC  
 +510 CACACTCACA GGGTCTGACG GTGGTGCACT TCCCCTTGAA CTCTGTTCTG  
 +560 GCCACCATGG GACCTGCCTG GGGACCAGTC AGACAGGTTT CCTGGGGCCC  
 +610 GCCTCCCCTG TGAACCTCAG CCTGGGGCAC AGGATGTGTT ACCGGGCTCA  
**rs9332364**  
 +660 CGGAGTGACT CAGGGAACCTA GTGCCGCCCC AGGGCCCCAA GGTGGGCGGT  
**rs9332365**  
 +710 TCGGTGATTC AGAGAGGGCA GCTCTGTGTT AGGACACACT GGGGCCAGCC  
**rs740601**  
 +760 AGGAAGGGTG GAAAAGATAG GGACCAGCGT GAGCATAGAG GCTAAGGGAC  
 +810 CATGGGAGCT CCAAGCGCGC TCACAGTGGG GACCAGGTCC TGGGGGCTGG  
**rs9332366**  
 +860 GGACACCAGG GAGGTGAAAT ACCCTCCAG CGGGTAGGGA GGGTGGGCAG  
**rs8140835**  
 +910 AGGAGGGCCA GCGGCCAGGC ATTTGGGAGG GGCTCCTGCT CTTTGGGAGA  
 +960 GGTGGGGGGC CGTGCCTGGG GATCCAAGTT CCCCTCTCTC CACCTGTGCT  
**rs4646313 rs4646314**  
 +1,010 CACCTCTCCT CCGTCCCCAA CCCTGCACAG GCAAGATCGT GGACGCCGTG Exon4  
**rs61910731 rs5031015**  
 +1,060 ATTCAGGAGC ACCAGCCCTC CGTGCTGCTG GAGCTGGGGG CCTACTGTGG  
**rs11544669**  
 +1,110 CTACTCAGCT GTGCGCATGG CCCGCTGCT GTCACCAGGG GCGAGGCTCA  
**rs769223 rs4818**  
 +1,160 TCACCATCGA GATCAACCCC GACTGTGCCG CCATCACCCA GCGGATGGTG  
**rs4986871 rs8192488**  
 +1,210 GATTTCGCTG GCGTGAAGGA CAAGGTGTGC ATGCCTGACC CGTTGTGAGA  
**rs4680**  
 +1,260 CCTGGAAAAA GGGCCGGCTG TGGGCAGGGA GGGCATGCGC ACTTTGTCTT  
**rs11569721**  
 +1,310 CCCACCAGG TGTTACACACC ACGTTCCTG AAAACCCACT ATCACCAGGC  
 +1,360 CCCTCAGTGC TTCCAGCCT GGGGCTGAGG AAAGACCCC CCAGCAGCTC  
 +1,410 AGTGAGGGTC TCACAGCTCT GGGTAAACTG CCAAGGTGGC ACCAGGAGGG  
 +1,460 GCAGGGACAG AGTGGGGCCT TGTCATCCA GAACCTAAA GAAAACCTGAT  
 +1,510 GAATGCTTGT ATGGGTGTGT AAAGATGGCC TCTGTCTGT GTGGGCGTGG  
 +1,560 GCACTGACAG GCGCTGTTGT ATAGGTGTGT AGGGATGGCC TCTGTCTGT  
 +1,610 GAGGACGTGG GCACTGACAG GCGCTGTTCC AGGTCACCCT TGTGGTTGGA Exon5  
 +1,660 GCGTCCCAGG ACATCATCCC CCAGCTGAAG AAGAAGTATG ATGTGGACAC  
**rs79048885**  
 +1,710 ACTGGACATG GTCTTCCTCG ACCACTGGAA GGACCGGTAC CTGCCGGACA  
**rs13306279 rs769224**  
 +1,760 CGCTTCTCTT GGAGGTGAGC CCCAACCAGG ATGGCATCCG TGCCAGCTGC  
**rs165631**  
 +1,810 TGCCAGAGC CCATTCAGTC AGCCTCAGCC TCTCCAAAGA GCCAGGCATT  
**rs4646315**  
 +1,860 CCAGTAGAGC CCTGTGTGGA CACAGCTCGC TCTGGAGGCA CCACCTGAGG  
 +1,910 TCTGGGAGTG TGGGGACTG AGGAGGCCCT GTGGTGGGTG GAGATGGGTG  
 +1,960 GGGAGCTGGG CCAGGGCCCT GGCTGGGTGG CCTGTTGGGA ACTGGGGAGC  
 +2,010 CAGCTGCCTG TGCAGGTGCA AAATGGGTGG CAGAAGTGGG GTGCACACCC  
**rs28565095**  
 +2,060 CAGACCAGAC ACCAGGGCAG AAACGACACA GGACCAAGGA GATGGGGTGG

**rs4646316 rs59801333**  
 +2,110 GGAAGGGCCG CTCTGGGCC AGCCTGCTCT CCCC**C**AAGCA AGCCACTGCT  
**rs4646317 rs34446512**  
 +2,160 CGTGCAAAGA AAGCA**T**GTGT CTCCTGCAGA TCTTCCTCCT GAGGCCCAT  
**rs34068292**  
 +2,210 CTTGTGCATT CCCCCAACC AGCCCCACTG GCGAGGACCC TGAGTGCCCC  
 +2,260 GAGTGAGGCT AGACAGCGGG TGGGGCTGTC CTCGCTTCCC TGGGGGGCGT  
 +2,310 GGGGCACTGG TGGCCCTTCA CAGACTGATG CTTAAGGAGC CTCACATCAG  
 +2,360 TGACACACTG CCCCATCCCT CCCTGGTGGT CAGCGACACT GAGTGGCTCT  
 +2,410 GTGATCCTCC ACTGGGCTTG GGACACCCAC CCTCACGGCC TCC**C**ACCTG  
**rs165737**  
 +2,460 GTGCTCGCTC ACCTGCAGCT CTCCAGAAA CTGGACTG CTGTTAGCAG  
 +2,510 CCG**G**ACTAGG AGCACGAGGG GCACAG**C**CCC CATGCCTGGC TAGGTAGGGC  
**rs165774 rs2904564**  
 +2,560 CGCTGGACCC TGGACAC**G**GA TTGGAAGGAA CCAGCACTAG CAGAAGCCTG  
**rs9332367**  
 +2,610 AGGTGTGAAA GGGCAGAGAA TGTTCCAGGA ACAATGGGAG TCAGGGCACA  
 +2,660 CAGGACTTTG GGCAGGTGAG GATGAGGTTA GACCTGTCTT CTGGAGCTGG  
 +2,710 GCTCAGGGGC TCATGCCTGT AACCTTGCA CTTTGGGAGG CTACGGCAGG  
 +2,760 AGGAGCGCTT GAGGCCAGGA GAGTTCGAGA CCAGCCTGGG CAACATGGCA  
 +2,810 AAAGAAAAA TATATATATA TATTTTAGAT GGAGTCTTGC TCTGTCACCA  
 +2,860 GGCTGGAGTG CAGTGGCACG ATCACGGCTC ACTGCAACCT CCACCTCTTG  
 +2,910 GGTTC**A**AGCG ATTACCCTGC CTTAGCCTCC TGAGTAGCTG GGACTACAGG  
 +2,960 CGCGCGCTGC CACACCCGGC TAGTTTTTTG TAGTTTAGTA GAGATGGGGT  
 +3,010 **T**TACCACAT TGGCCAGGAT GGTCTCAATA TCCTGACTTC GTGATCCGCC  
**rs165895**  
 +3,060 GCCTCGGCC TCCCAAAGTG CTGGGATTAC AGGCGTGAGC CACTGCGTCC  
 +3,110 GGCCG**T**ATTC CAGCTTT**C**AA AACAACAAA AACAACAAA ACTTTTCTGG  
**rs174696 rs9306234**  
 +3,160 AAAGATCCCT GTCAGCCTTG TGGAGTGTGG AGAGGGCTGT GGGGAGGGCA  
 +3,210 TTT**C**AGATGC CCTGAACTCA CGAGGAGGCA **C**TGAACCTG GCCGTGGAGA  
**rs5746850**  
 +3,260 GGGAGGACCT GTAGTGGCCA AGGGGGTGGG CATTGGGAGG GTGGGAGGGA  
 +3,310 GACCTACAGG CCAAGACAGG GTAGCTGGAG **G**GGGGCTCAC CCCTGACAAA  
**rs9332368**  
 +3,360 GGAGCATGAT GCTGGCAATT GGGTATTGAT GGCAGAGAGC TGGCACTCAG  
 +3,410 CCAGATGGGC TTCACTTGGG CAGGAAAGAC ACCCACAGCT GGGCCTGCGT  
 +3,460 TACTGCGGCC GAGTTTCAGC AGCTGTGATG TGGGTGCTAA TTACAGGGGC  
 +3,510 CTGCCTTCAT AGAAAAGTAG CAAACATTGC AGTTTAGTAA CTAGGAAACT  
 +3,560 AATAGTTTT**C** TCAGTGCTGC TTGCGCAAAG CTGGTAATTA TCTCAAAGA  
 +3,610 AGCAAAGTCA TGAAGTGGGA AGTCA**T**GAAT TGGGAATGGG TGTCCTTGTT  
**rs9332369**  
 +3,660 AAACGCACAT CTGCACACTC AGGGCTGGGG CCCTGTGCCC CCTTGTGGAG  
 +3,710 GGTTAGGGGA CAACCTGGCT CTTGTGAGGG TCTAGCCATC CCCTCAGTGG  
 +3,760 GTTCTGTGAG CATCGGAGGC ACG**A**GGGGTG AGGGGCTCAG GAGCAGGTTG  
**rs174697**  
 +3,810 CAATTCAA**A** TCAAGGGCTG CTT**T**GAGGAG GCCTCTCCAC **C**GGGCTGCTG  
**rs1109436 rs9332370**  
 +3,860 TAGTCACCAA GTCCAGCCA TGCCCAAAGG AAGAGGAATG AGTTCCCCCT  
 +3,910 TAAAA**A**AAAAA AAAAA**A**AA GAAAAAGACA GAGTCTTGCT CTGTGCCAG  
**rs13054356**  
 +3,960 GCTGGAGTGC AGTGATGACA TCATAGCTCA CTGTAGCCTC AAACCTCTGA  
 +4,010 GCTCCAGTGA TCCTCCACC TCAGCTCCT GAGTAGCTAG **G**ACTAAAGGC  
**rs9332371**  
 +4,060 ATGCACCACT ACACCTGGCT AATTTAAAAA TTTTTGTAG AAATGGGGTC

+4,110 TCCCTATGTT GCCCAGACTG GTCTCAAACCT CCTGGCCTCA AGCGATCCTC  
 +4,160 TTGCCTCAAC CTCCCAAAGT GCTGGGAGTA CAGGTGTGTG CTTGGTCTGA  
**rs9332373**  
 +4,210 GGCTCCAAC TTTTGTGTT GTTTCTCGAG ACAGTCTCTC GCTCTGT**CGC**  
**rs174698 rs12158230**  
 +4,260 CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC GCGATCTTGG CTCCCTGCAA CCTCTGTGAG  
 +4,310 GCTCCAACCTC TTGAAGGGAG GAGAGTCTAA GGAGGGTGGG CCAGATGAAA  
 +4,360 ACCACCTCAG CATAGTGTCA CCTGCTCCTC TGACACTGTC **GCTTCTCCAC**  
**rs9332374 rs174699**  
 +4,410 GGCATTAGAT TTTTCTGCTT GCTCAGACGC TGATGCATGT TTAGCCAGTT  
 +4,460 CTCCAGGTGG TCTGAGTAGC TGGTAGGAGG CTTGCAGTGT GGGGCGACAG  
 +4,510 GCAGGACAGG TGCTGCCTTC TTTCCCTCT TGACCAGTTT CGTAAAGGAG  
 +4,560 TGGGCCCTCG GCAGCCTCCA AAGGTGACCC ATGCTCCTTT CTGCCCTTCC  
 +4,610 CTCCTTCTTT CCTGTTTAAAC TCGTGCAGGT GCAGTGGTCT GGTGTCTTTT  
 +4,660 AGTCCGCTGA CGTCTTCTGT ATCCCTGATG ACCAGATTGG GCTCCTGAGT  
 +4,710 CCCCTGGCGC AACCCGAGAA GTCCAGGAGC CCAGGCCCTT CACTCATGCA  
 +4,760 TTCCCTGGCC CAGACTGGAA GGCAGCCGCC CTGCTCAAGG CCTAGGCCAT  
**rs4646318**  
 +4,810 TGTCTCCTC CCGGGTGGCG CTTTGTCTTA CGTCTTTTCA GCTGACATTG  
 +4,860 CTAGGACATT TTTTTTTTTT TCTAAATGAA AACACATCAT GATTCATGGT  
 +4,910 GGTACTTCTT GCTCAACTCC GGACCTTGGG GCTGTCCCCT GACCTCACTG  
 +4,960 ACCTTGCAAG **CGTGTGGTGT** CCATACTGTC ACATGAAAGC CCCCTGCTTT  
**rs9332375**  
 +5,010 CTCTGCAGCA TACAGGCTGG AAACGACCGC CACCCACCAC CAGGACAGCT  
 +5,060 GCAAGCCCTG TGGGACTCTC **CAGGCCCATC** CCAGAGGCAT GTGGGGT**CGG**  
**rs9332376 rs9306235**  
 +5,110 ATACCAGTGT TTCAAGGCAC CTGCCTGCAA ATTGATTTTA TTATACTTTA  
 +5,160 GATGTTTGGG ATTGCTTGTT AACTTTTGTT TGGTGAATAA GTCAAATTTT  
 +5,210 CAAGACAAGG TGACTGGGGT GTCCCTTGCC CTGGTAGGTC TTCCCTCCCC  
 +5,260 ATAGGCAAAC ACTTCTCTC AAGGTTTCTT GTTTATGTGA TGTAAGCAAA  
 +5,310 CCCTTTTCTG ATAGCA**TAGA** TAGGCAAGCA TCCTATGAGG TTTCTCCCGA  
**rs5993889**  
 +5,360 TAGTGGACCC **CACGGGCCAT** GCCCTATGGC TGCCTGTCCA GTAACAACCT  
**rs28562050**  
 +5,410 CTTCTTCTG CACAGAACC AGGCAGAGGA ACTCTGTGTC CTCCCAGGGC  
 +5,460 CCAGGCACTG GTGAAGATGG GGGGTCTGCA AATGCAGGAG CTTGGGGATG  
 +5,510 TCCAGAACTG ACCCAAGGG GCAGGCTTGT TGATGGGAGG TCTGCCCCAC  
 +5,560 CTCAGCCCTG CAGGGTCACC CTGGTCAGGC CAATATTGTC TCCAGGGACC  
 +5,610 ATACCAGCAA **CCCCTCTCCT** TGGGTGCCCT TCC**TC**CATAG GCCTGAGTTC  
**rs72547415 rs9332377**  
 +5,660 CTGGCACTGG **GTGTTGAGGG** CCCCATTTGT TCCACTCACC CAGCTAGCAT  
**rs72547416**  
 +5,710 TTATTGAGCA CCTACTGTGT GCCACATGCT GTTCTAAGGG ATGGATACTC  
 +5,760 CTGAGATGGA TACAGGAGTT GATGAGAGAA AGGTCCCTGT CCTCACGGGG  
 +5,810 CCCATGTTCT GAAGGTGGCA **CCCAAGTCTT** GTACAGTCCT TTCCTGCAGG  
**rs9332378**  
 +5,860 AGTCACGCTG GGCAGAAAGT GGAAACCT**GG** CCCAGGGGGC TAGGCACAGG  
**rs13306277**  
 +5,910 **CGTGGTGCCG** TGGCCTAGTG AGGAGCACCC ATCCTGGTTT GGGGCAGGTT  
**rs13055002**  
 +5,960 CTCTGGGCAC CTCTGACCCT CACCTCCCC ACCCCCCGGT CTGTTTGCAG  
 +6,010 **GAATGTGGCC** TGCTGCGGAA GGGGACAGTG **CTACTGGCTG** ACAACGTGAT  
 +6,060 **CTGCCAGGT** GCGCCAGACT TCCTAGCACA **CGTGC**CGGG AGCAGCTGCT  
 +6,110 **TTGAGTGAC** ACACTACCAA TCGTTCCTGG AATACAGGGA GGTGGTGGAC  
 +6,160 **GGCCTGGAGA** AGGCCATCTA CAAGGGCCCA GGCAGCGAAG CAGGGCC**CTG**

Exon6



+6,210 Actgcccccc cggccccct ctcgggctct ctcaccagc ctggtactga  
 Stop codon rs76902350 rs75081694 rs77547810 rs12814  
 +6,260 aggtgccaga cgtgctcctg ctgaccttct gcggctccgg gctgtgtcct  
 +6,310 aaatgcaaag cacacctcgg ccgaggcctg cgccctgaca tgctaacctc  
 +6,360 tctgaactgc aacactggat tgttctttt taagactcaa tcatgacttc  
 rs9332380 rs14968 rs11544667  
 +6,410 tttaactaaca ctggctagct atattatctt atataactaat atcatgtttt  
 +6,460 aaaaatataa aatagaaatt a  
 +6,481 agaactctaaa tatttagata taaactcgact tagtacatcc ttctcaactg  
 rs9332381  
 +6,531 ccattcccct gctgcccttg acttgggac caaacattca aagctcccct  
 +6,581 tgacggacgc taacgctaag ggcggggccc ctagctggct gggttctggg  
 +6,631 tggcacgcct ggcccactgg cctcccagcc acagtgggac agaggtcagc  
 +6,681 cctcctgcag ctagggcagg ggcacctgtt agccccatgg ggacgactgc  
 +6,731 cggcctggga aacgaagagg agtcagccag cattcacacc tttctgacca  
 rs165599  
 +6,781 agcagggcgt ggggacaggt ggaccccga gcagcaccag cccctctggg  
 rs36082074  
 +6,831 ccccatgtgg cacagagtgg aagcatctcc ttcctactc cccactgggc  
 rs35478083  
 +6,881 cttgcttaca gaagaggcaa tggctcagac cagctcccgc atccctgtag  
 rs35593000 rs35481270  
 +6,931 ttgcctccct ggcccactgag tgaggatgca gtgctggtt ctgcccacct  
 rs9332382 rs165728  
 +6,981 acacctagag ctgtcccat ctctccaag gggtcagact gctagccacc  
 +7,031 tcagaggctc caagggccca gttcccaggc ccaggacagg aatcaaccct  
 +7,081 gtgctagctg agttcacctg caccgagacc agcccctagc caagattcta  
 +7,131 ctctgggct caaggcctgg ctagcccca gccagcccac tcctatggat  
 +7,181 agacagacca gtgagcccaa gtggacaagt ttggggccac ccagggacca  
 rs60537793  
 +7,231 gaaacagagc ctctgcagga cacagcagat gggcacctgg gaccacctcc  
 +7,281 acccagggcc ctgccccaga cgcgacagag cccgacacaa gggagaagcc  
 +7,331 agccacttgt gccagacctg agtggcagaa agcaaaaagt tcctttgctg  
 +7,381 ctttaatttt taaattttct tacaataatt taggtgttta ccaatagtct  
 +7,431 tattttggct tatttttaat gctttttctc agtgtttttc ttctgtttct

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT*

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs72556513	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4485648	C/T	Promoter	-	56	T (0.83)	C (0.17)	44	T (0.92)	C (0.08)	43	T (0.88)	C (0.12)	55	T (0.51)	C (0.49)
rs72554693	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72550765	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9605029	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4497958	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993877	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4626020	A/C	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73385608	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9606186	C/G	Promoter	-	47	G (0.51)	C (0.49)	40	G (0.75)	C (0.25)	40	G (0.77)	C (0.22)	49	G (0.56)	C (0.44)
rs5746846	C/G	Promoter	-	54	C (0.50)	G (0.50)	43	G (0.78)	C (0.22)	43	G (0.76)	C (0.24)	52	C (0.54)	G (0.46)
rs73880017	A/C	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs10483103	A/G	Promoter	-	56	G (0.97)	A (0.03)	44	G (0.64)	A (0.36)	43	G (0.71)	A (0.29)	55	G (1.00)	A (0.00)
rs5746847	C/T	Promoter	-	110	C (0.62)	T (0.38)	81	C (0.73)	T (0.27)	82	C (0.76)	T (0.24)	108	C (0.70)	T (0.30)
rs9618716	C/T	Promoter	-	47	T (1.00)	C (0.00)	43	T (1.00)	C (0.00)	40	T (1.00)	C (0.00)	106	T (0.83)	C (0.17)
rs9605030	C/T	Promoter	-	109	C (0.84)	T (0.16)	82	C (0.70)	T (0.30)	82	C (0.67)	T (0.33)	53	C (1.00)	T (0.00)
rs73880018	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5748479	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9605031	C/T	Promoter	-	111	C (0.66)	T (0.34)	82	C (0.68)	T (0.32)	82	C (0.65)	T (0.35)	108	C (0.93)	T (0.07)

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs8140265	A/G	Promoter	-	110	G (0.66)	A (0.34)	82	G (0.68)	A (0.32)	82	G (0.65)	A (0.35)	108	G (0.93)	A (0.07)
rs56384146	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs55760283	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5748480	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9618717	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5748481	A/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5748482	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5748483	A/G	Promoter	-	54	G (0.56)	A (0.44)	40	G (0.77)	A (0.22)	42	G (0.77)	A (0.23)	49	G (0.69)	A (0.31)
rs41506746	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12483995	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5748484	C/T	Promoter	-	56	C (0.69)	T (0.31)	44	C (0.67)	T (0.33)	43	C (0.65)	T (0.35)	55	C (0.98)	T (0.02)
rs5993878	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs6518589	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72547412	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72547413	G/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5746848	C/T	Promoter	-	56	C (0.51)	T (0.49)	44	C (0.77)	T (0.23)	43	C (0.76)	T (0.24)	52	T (0.54)	C (0.46)
rs5748485	A/G	Promoter	-	111	G (0.62)	A (0.38)	82	G (0.74)	A (0.26)	81	G (0.77)	A (0.23)	108	G (0.70)	A (0.30)
rs55733201	C/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5748486	C/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสnpสับนยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ชาฮารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs72547414	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs6518591	A/G	Promoter	-	111	A (0.84)	G (0.16)	82	A (0.89)	G (0.11)	79	A (0.92)	G (0.08)	105	A (0.60)	G (0.40)
rs35141198	A/C/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35325963	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9618719	C/T	Promoter	-	56	C (1.00)	T (0.00)	44	C (1.00)	T (0.00)	43	C (1.00)	T (0.00)	49	C (0.86)	T (0.14)
rs5748487	G/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11705619	C/T	Promoter	-	110	T (0.84)	C (0.16)	82	T (0.98)	C (0.02)	82	T (0.92)	C (0.08)	108	T (0.95)	C (0.05)
rs9606189	C/G	Promoter	-	56	G (0.69)	C (0.31)	44	G (0.67)	C (0.33)	44	G (0.67)	C (0.33)	55	G (0.98)	C (0.02)
rs12163193	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73385635	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12159943	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73385636	G/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73880021	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2078748	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73385638	A/C	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs8135990	A/C	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs55704968	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9606190	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2871047	A/G	Promoter	-	53	G (0.97)	A (0.03)	42	G (0.65)	A (0.35)	41	G (0.72)	A (0.28)	51	G (1.00)	A (0.00)

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสnpสับนยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs5748489	A/C	Promoter	-	111	C (0.62)	A (0.38)	82	C (0.74)	A (0.26)	82	C (0.76)	A (0.24)	108	C (0.76)	A (0.24)
rs62223664	C/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34307548	insG/-	Promoter		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332307	G/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5992496	A/C	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5992497	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332310	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332311	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35958727	insA/-	Promoter		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332312	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72547471	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332313	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332314	C/T	Promoter	-	56	C (0.99)	T (0.01)	44	C (1.00)	T (0.00)	43	C (1.00)	T (0.00)	55	C (1.00)	T (0.00)
rs1800706	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2075507	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332315	C/T	Promoter	-	56	T (1.00)	C (0.00)	82	T (0.95)	C (0.05)	82	T (0.99)	C (0.01)	55	T (1.00)	C (0.00)
rs1800749	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45478499	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45521239	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสnpสับนยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ซับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs79019435	G/T	Promoter		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45553733	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45604238	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45551837	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs58097503	A/C	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45535931	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646310	A/G	Promoter	-	110	G (0.84)	A (0.16)	82	G (0.98)	A (0.02)	82	G (0.92)	A (0.08)	108	G (0.95)	A (0.05)
rs2020917	C/T	Promoter	-	111	C (0.66)	T (0.34)	82	C (0.68)	T (0.32)	82	C (0.65)	T (0.35)	108	C (0.92)	T (0.08)
rs45559342	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13306278	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646311	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45511293	insG/-	Promoter		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45584533	insG/-	Promoter		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45536341	C/T	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45581136	A/G	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45593642	A/C	Promoter	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs1805052	C/G	5' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45454096	A/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs3788319	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs56901835	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs3788320	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs3788321	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs60214071	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9306231	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34939541	insC/-	Intron		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9306232	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs58155206	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9306233	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs737866	A/G	Intron	-	111	T (0.67)	C (0.33)	82	T (0.69)	C (0.31)	82	T (0.65)	C (0.35)	108	T (0.89)	C (0.11)
rs737865	C/T	Intron	-	110	A (0.67)	G (0.33)	82	A (0.69)	G (0.31)	82	A (0.65)	G (0.35)	108	A (0.89)	G (0.11)
rs57384068	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12483960	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs737864	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs57714936	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5844401	delC/-	Intron		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12628871	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332316	C/T	Intron	-	111	C (0.98)	T (0.02)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332317	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs9332318	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73385647	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs45616631	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34663805	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs28673591	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11703431	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs933269	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs933270	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs71312726	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34218527	delTG/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs933271	C/T	Intron	-	111	T (0.71)	C (0.29)	82	T (0.57)	C (0.43)	82	T (0.58)	C (0.42)	108	T (0.52)	C (0.48)
rs36111598	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5844402	delG/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34438295	delG/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5844403	delG/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34691071	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs1544325	A/G	Intron	-	111	G (0.62)	A (0.38)	81	G (0.73)	A (0.27)	82	G (0.77)	A (0.23)	108	G (0.75)	A (0.25)
rs79001037	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs74610916	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A



ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ชาฮารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs76085534	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs6518593	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34937293	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs7291003	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35558779	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs7287550	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34029447	insT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35527466	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12053782	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34798238	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11913025	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332319	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs8185002	G/T	Intron	-	111	T (0.67)	G (0.33)	81	T (0.72)	G (0.28)	81	T (0.65)	G (0.35)	108	T (0.90)	G (0.10)
rs57039617	delAA/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332321	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332322	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332323	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5748490	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993879	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับเบสยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs9332325	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174673	C/G	Intron	-	111	G (0.95)	C (0.05)	82	G (0.69)	C (0.31)	82	G (0.71)	C (0.29)	N/A	N/A	N/A
rs9332327	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332328	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174674	A/G	Intron	-	108	G (0.70)	A (0.30)	82	G (0.58)	A (0.42)	80	G (0.57)	A (0.43)	107	G (0.61)	A (0.39)
rs174675	C/T	Intron	-	111	C (0.71)	T (0.29)	82	C (0.58)	T (0.42)	82	C (0.58)	T (0.42)	108	C (0.61)	T (0.39)
rs11703069	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35188675	insG/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174676	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35689277	delT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174677	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174678	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs78405422	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9606193	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174679	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35791904	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35280052	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993880	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332331	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสnpสับนยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)			
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	
rs174680	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332332	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332333	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	82	G (0.92)	A (0.08)	82	G (0.98)	A (0.02)	108	G (0.86)	A (0.14)	
rs9332334	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174681	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12167215	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332336	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs78761064	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332337	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332338	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs76236213	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77039094	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332339	insT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2855231	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs75353571	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332340	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs78841145	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174682	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs78785840	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs74823730	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77673456	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs79413333	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs78360424	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77139602	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs80221940	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs76903563	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs76377895	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332342	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73433608	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332343	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174683	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5992498	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174684	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72554680	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72547447	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9606194	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174685	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993881	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs71186636	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs28600912	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73385665	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72556506	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993882	G/T	Intron	-	111	T (0.77)	G (0.23)	82	T (0.88)	G (0.12)	81	T (0.86)	G (0.14)	106	T (0.63)	G (0.37)
rs5993883	G/T	Intron	-	111	G (0.57)	T (0.43)	82	T (0.60)	G (0.40)	81	T (0.52)	G (0.48)	108	T (0.51)	G (0.49)
rs35014456	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35777291	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11089323	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12170804	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs66533042	delT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs71820700	delT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs71705736	delT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993884	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11703339	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11703340	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9606195	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs55653258	delT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9617852	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ชาฮารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs76599029	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs76157168	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174686	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73385671	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174687	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73385673	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174688	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2004497	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs71679458	insAA/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs66863345	insA/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs739368	C/T	Intron	-	56	G (1.00)	A (0.00)	44	G (1.00)	A (0.00)	43	G (1.00)	A (0.00)	108	G (0.77)	A (0.23)
rs174689	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174690	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174691	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72549225	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9605040	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174692	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993886	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs28804429	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs35788262	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11704299	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993887	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs74607110	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165879	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs71317164	insC/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs78091679	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs28621910	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs3819619	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs3087869	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs1055503	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs74451762	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5992499	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5992500	C/T	Intron	-	56	C (1.00)	T (0.00)	44	C (0.89)	T (0.11)	43	C (0.93)	T (0.07)	55	C (0.88)	T (0.12)
rs9332344	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs3819621	A/G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332346	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332347	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34966851	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับเบสในยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs34300220	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs7290221	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5992501	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332348	C/T	Intron	-	109	C (1.00)	T (0.00)	82	C (0.99)	T (0.01)	81	C (0.99)	T (0.01)	104	C (0.97)	T (0.03)
rs5746849	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332349	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332350	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332351	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	82	A (0.88)	G (0.12)	82	A (0.96)	G (0.04)	108	A (0.86)	G (0.14)
rs9332354	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332355	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332356	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332357	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs8140865	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs8136901	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9680656	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13054814	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12167365	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12168881	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs57405867	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A



ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ชาฮารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs165767	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993888	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs740603	A/G	Intron	-	56	G (0.53)	A (0.47)	44	A (0.55)	G (0.45)	39	G (0.51)	A (0.49)	55	A (0.59)	G (0.41)
rs71312727	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs16982842	C/T	Intron	-	111	C (1.00)	T (0.00)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	107	C (0.96)	T (0.04)
rs56104268	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11912495	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11912353	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11912354	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174693	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9606196	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174695	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73880029	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs16982844	A/C	Intron	-	111	C (0.94)	A (0.06)	44	C (1.00)	A (0.00)	43	C (1.00)	A (0.00)	107	C (1.00)	A (0.00)
rs35617967	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77666210	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646312	C/T	Intron	-	111	T (0.58)	C (0.42)	82	T (0.59)	C (0.41)	82	T (0.62)	C (0.38)	108	T (0.86)	C (0.14)
rs34778315	insG/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34450201	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสnpสับนยีน COMT (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs13306280	A/G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35919169	A/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs79505377	C/G	5' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11569715	C/G	5' UTR	-	55	C (1.00)	G (0.00)	43	C (1.00)	G (0.00)	43	C (1.00)	G (0.00)	55	C (0.96)	G (0.04)
rs5748492	G/T	5' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35357972	insG/-	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34686565	A/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332358	C/T	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165656	C/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	44	G (0.78)	C (0.22)	42	G (0.80)	C (0.20)	N/A	N/A	N/A
rs9332359	A/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332360	C/T	Intron	-	54	C (1.00)	T (0.00)	43	C (1.00)	T (0.00)	43	C (1.00)	T (0.00)	55	C (1.00)	T (0.00)
rs9332361	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165722	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332362	A/G	Intron	-	111	G (0.96)	A (0.04)	81	G (0.98)	A (0.02)	82	G (0.98)	A (0.02)	N/A	N/A	N/A
rs11569720	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77839981	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11569718	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11569719	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332363	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสnpสับนยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ซับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs3810595	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11569717	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11569716	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35920235	insA/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs6268	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs6269	A/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs78977979	C/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72563160	C/T	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11544670	G/T	Coding exon	L9F	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs6270	C/G	Coding exon	C34S	56	G (1.00)	C (0.00)	44	G (1.00)	C (0.00)	43	G (1.00)	C (0.00)	55	G (1.00)	C (0.00)
rs75012854	G/A	Coding exon	D39N	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs74745580	T/C	Coding exon	N39N	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72549343	A/C	Coding exon	L50L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4633	C/T	Coding exon	H62H	110	C (0.52)	T (0.48)	81	C (0.71)	T (0.29)	82	C (0.75)	T (0.25)	108	C (0.69)	T (0.31)
rs76384862	T/C	Coding exon	N71N	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs6267	G/T	Coding exon	A72S	108	G (0.99)	T (0.01)	81	G (0.94)	T (0.06)	78	G (0.96)	T (0.04)	104	G (0.99)	T (0.01)
rs740602	A/G	Coding exon	Q73Q	N/A	N/A	N/A	38	G (1.00)	A (0.00)	39	G (1.00)	A (0.00)	53	G (0.75)	A (0.25)
rs13306281	A/G	Coding exon	V92M	53	G (1.00)	A (0.00)	41	G (1.00)	A (0.00)	40	G (1.00)	A (0.00)	51	G (1.00)	A (0.00)
rs76452330	A/G	Coding exon	D94N	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวยุโรป (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs3218737	C/T	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34819182	G/T	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2239393	A/G	Intron (boundary)	-	111	A (0.57)	G (0.43)	82	A (0.59)	G (0.41)	82	A (0.62)	G (0.38)	108	A (0.58)	G (0.42)
rs34234839	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs75972414	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332364	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332365	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs740601	A/C	Intron	-	110	T (0.57)	G (0.43)	82	T (0.59)	G (0.41)	82	T (0.60)	G (0.40)	108	T (0.56)	G (0.44)
rs9332366	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs8140835	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646313	A/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646314	G/T	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77825904	A/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs61910731	G/T	Coding exon	V100L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5031015	A/G	Coding exon	A102T	56	G (1.00)	A (0.00)	44	G (1.00)	A (0.00)	43	G (1.00)	A (0.00)	108	G (0.99)	A (0.01)
rs11544669	C/G	Coding exon	L112L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs769223	A/G	Coding exon	A134A	56	G (1.00)	A (0.00)	44	G (1.00)	A (0.00)	43	G (1.00)	A (0.00)	55	G (1.00)	A (0.00)
rs4818	C/G/T	Coding exon	L136L	58	C(0.59)	G(0.41)	45	C (0.61)	G (0.39)	44	C(0.58)	G (0.42)	59	C(0.84)	G(0.16)
rs4986871	C/T	Coding exon	A146V	N/A	N/A	N/A	44	C (1.00)	T (0.00)	43	C (1.00)	T (0.00)	54	C (1.00)	T (0.00)

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสnp สืบพันธ์ยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs8192488	C/T	Coding exon	A146A	109	C (0.99)	T (0.01)	81	C (0.99)	T (0.01)	N/A	N/A	N/A	104	C (0.93)	T (0.07)
rs4680	A/G	Coding exon	V158M	110	G (0.51)	A (0.49)	82	G (0.70)	A (0.30)	82	G (0.73)	A (0.27)	108	G (0.69)	A (0.31)
rs11569721	G/T	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs79048885	A/G	Coding exon	G170G	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13306279	C/T	Coding exon	P199L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs769224	A/G	Coding exon	P199P	111	G (0.99)	A (0.01)	82	G (0.90)	A (0.10)	82	G (0.98)	A (0.02)	108	G (0.88)	A (0.12)
rs165631	C/T	Coding exon	L203L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646315	A/C/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs28565095	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646316	C/T	Intron	-	111	C (0.78)	T (0.22)	81	C (0.62)	T (0.38)	82	C (0.62)	T (0.38)	106	C (0.85)	T (0.15)
rs11569721	G/T	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs79048885	A/G	Coding exon	G170G	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13306279	C/T	Coding exon	P199L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs769224	A/G	Coding exon	P199P	111	G (0.99)	A (0.01)	82	G (0.90)	A (0.10)	82	G (0.98)	A (0.02)	108	G (0.88)	A (0.12)
rs165631	C/T	Coding exon	L203L	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646315	A/C/G	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs28565095	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs4646316	C/T	Intron	-	111	C (0.78)	T (0.22)	81	C (0.62)	T (0.38)	82	C (0.62)	T (0.38)	106	C (0.85)	T (0.15)
rs59801333	G/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ชาฮารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs4646317	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77615923	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34446512	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34068292	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs34016976	insC/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165737	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165774	A/G	Intron	-	110	G (0.68)	A (0.32)	81	G (0.80)	A (0.20)	79	G (0.83)	A (0.17)	108	G (0.77)	A (0.23)
rs2904564	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332367	A/G	Intron	-	50	G (1.00)	A (0.00)	42	G (1.00)	A (0.00)	43	G (0.99)	A (0.01)	108	G (0.98)	A (0.02)
rs165895	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174696	C/T	Intron	-	111	T (0.78)	C (0.22)	82	T (0.57)	C (0.43)	82	T (0.52)	C (0.48)	108	C (0.62)	T (0.38)
rs9306234	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5746850	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332368	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332369	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35819339	delC/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174697	A/G	Intron	-	111	G (0.95)	A (0.05)	82	G (0.70)	A (0.30)	82	G (0.67)	A (0.33)	108	G (0.80)	A (0.20)
rs80244944	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs1109436	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวยุโรป (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs9332370	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13054356	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs67001869	-/AA	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs66718686	-/AA	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72022678	-/AA	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13054356	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs57267728	-/AA	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs74447165	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332371	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332372	delT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332373	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174698	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12158230	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332374	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs174699	C/T	Intron	-	111	T (0.94)	C (0.06)	82	T (0.69)	C (0.31)	82	T (0.65)	C (0.35)	108	T (0.99)	C (0.01)
rs4646318	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs68091468	delT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs61143203	delT/-	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332375	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสnpสับนยีน COMT (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs9332376	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9306235	A/G	Intron	-	111	G (0.92)	A (0.08)	42	G (1.00)	A (0.00)	42	G (1.00)	A (0.00)	53	G (1.00)	A (0.00)
rs5993889	G/T	Intron	-	56	T (1.00)	G (0.00)	44	T (1.00)	G (0.00)	43	T (1.00)	G (0.00)	108	T (0.88)	G (0.12)
rs28562050	A/C	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72547415	A/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332377	C/T	Intron	-	111	C (0.82)	T (0.18)	82	C (0.99)	T (0.01)	43	C (1.00)	T (0.00)	108	C (0.64)	T (0.36)
rs72547416	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332378	C/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs76296330	C/T	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13306277	A/G	Intron	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs13055002	C/T	Intron (boundary)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs362204	insC/-	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs71722878	insC/-	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72552064	delC/-	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs3838146	insC/-	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs76902350	G/C	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs71787432	insC/-	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs75081694	C/G	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77547810	G/c	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A



ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ซับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs12814	A/T	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332380	A/G	3' UTR	-	55	G (1.00)	A (0.00)	42	G (1.00)	A (0.00)	42	G (1.00)	A (0.00)	108	G (0.94)	A (0.06)
rs14968	C/T	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs11544667	A/G	3' UTR	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332381	C/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165599	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs36082074	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35478083	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35593000	G/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs35481270	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332382	G/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165728	C/T	Downstream	-	111	T (0.95)	C (0.05)	82	T (0.69)	C (0.31)	82	T (0.66)	C (0.34)	108	T (0.96)	C (0.04)
rs60537793	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9265	A/C	Downstream	-	111	A (0.68)	C (0.32)	81	A (0.60)	C (0.40)	82	A (0.63)	C (0.37)	106	C (0.72)	A (0.28)
rs9332383	A/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs77450088	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73387711	C/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9332384	A/C/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165655	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับเบสในยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ชาฮารา (YRI)			
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	
rs165840	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs73150820	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72554698	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72554699	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72554701	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs165849	A/G	Downstream	-	111	A (0.67)	G (0.33)	81	A (0.57)	G (0.43)	82	A (0.62)	G (0.38)	107	G (0.82)	A (0.18)	
rs7288060	A/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	40	T (1.00)	A (0.00)	42	T (1.00)	A (0.00)	54	T (0.94)	A (0.06)	
rs72554700	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs35219372	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs5993890	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs9606199	G/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs13056165	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs12329964	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs62223683	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs165824	A/G	Downstream	-	111	A (0.93)	G (0.07)	82	A (0.59)	G (0.41)	81	A (0.64)	G (0.36)	108	A (0.91)	G (0.09)	
rs34445280	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs34638476	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs34687532	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
rs165815	C/T	Downstream	-	111	T (0.86)	C (0.14)	82	T (0.57)	C (0.43)	82	T (0.62)	C (0.38)	108	C (0.57)	T (0.43)	

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ซับ-ซาสารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs35072297	G/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs5993891	C/T	Downstream	-	111	C (0.93)	T (0.07)	82	C (0.98)	T (0.02)	82	C (0.98)	T (0.02)	108	C (0.56)	T (0.44)
rs62223684	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2073744	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs62223685	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs71313931	C/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2518823	C/T	Downstream	-	48	C (0.94)	T (0.06)	42	T (0.55)	C (0.45)	42	C (0.61)	T (0.39)	54	C (0.89)	T (0.11)
rs71313932	C/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs758373	C/T	Downstream	-	111	G (0.93)	A (0.07)	81	G (0.98)	A (0.02)	82	G (0.98)	A (0.02)	108	G (0.56)	A (0.44)
rs13058011	C/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2240715	C/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12169508	C/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	43	G (1.00)	C (0.00)	43	G (1.00)	C (0.00)	N/A	N/A	N/A
rs2240714	A/G	Downstream	-	54	C (0.92)	T (0.08)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2240713	A/G	Downstream	-	111	C (0.94)	T (0.06)	82	C (0.98)	T (0.02)	81	C (0.98)	T (0.02)	108	C (0.91)	T (0.09)
rs2073749	C/T	Downstream	-	56	G (1.00)	A (0.00)	44	G (1.00)	A (0.00)	43	G (1.00)	A (0.00)	55	G (1.00)	A (0.00)
rs73387719	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs2239394	A/G	Downstream	-	56	G (0.92)	A (0.08)	44	G (0.97)	A (0.03)	43	G (0.99)	A (0.01)	55	G (0.55)	A (0.45)
rs887199	A/G	Downstream	-	111	G (0.86)	A (0.14)	82	G (0.57)	A (0.43)	82	G (0.57)	A (0.43)	108	A (0.57)	G (0.43)
rs2239395	G/T	Downstream	-	111	T (0.94)	G (0.06)	82	T (0.98)	G (0.02)	82	T (0.98)	G (0.02)	108	T (0.58)	G (0.42)

ตารางที่ 30 แสดงตำแหน่งสลับยีน *COMT* (ต่อ)

SNP rs#	Alleles	Role	Amino acid position	ชาวยุโรป (CEU)			ชาวจีน (CHB)			ชาวญี่ปุ่น (JPT)			แอฟริกัน ชิบ-ชาฮารา (YRI)		
				Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele	Sample	Major Allele	Minor Allele
rs1110477	C/T	Downstream	-	110	T (0.94)	C (0.06)	82	T (0.69)	C (0.31)	82	T (0.66)	C (0.34)	108	T (0.89)	C (0.11)
rs28509408	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs72563795	G/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs1110478	C/T	Downstream	-	110	T (0.87)	C (0.13)	82	T (0.57)	C (0.43)	82	T (0.62)	C (0.38)	108	C (0.56)	T (0.44)
rs1110479	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	40	C (0.65)	T (0.35)	40	C (0.68)	T (0.32)	54	C (0.90)	T (0.10)
rs12627876	C/T	Downstream	-	50	C (1.00)	T (0.00)	40	C (0.91)	T (0.09)	43	C (0.98)	T (0.02)	52	C (0.96)	T (0.04)
rs2518824	G/T	Downstream	-	47	T (0.70)	G (0.30)	41	T (0.52)	G (0.48)	42	T (0.67)	G (0.33)	55	G (0.74)	T (0.26)
rs34134422	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs9606201	A/G	Downstream	-	56	G (1.00)	A (0.00)	44	G (1.00)	A (0.00)	43	G (1.00)	A (0.00)	55	G (1.00)	A (0.00)
rs73880035	C/T	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs887200	C/T	Downstream	-	111	T (0.87)	C (0.13)	82	T (0.57)	C (0.43)	82	T (0.62)	C (0.38)	108	C (0.56)	T (0.44)
rs10427983	C/T	Downstream	-	54	T (1.00)	C (0.00)	44	T (1.00)	C (0.00)	43	T (1.00)	C (0.00)	53	T (0.75)	C (0.25)
rs2240718	A/C	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12168906	A/G	Downstream	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs16982871	A/G	Downstream	-	109	C (1.00)	T (0.00)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
rs12165997	A/G	Downstream	-	56	G (1.00)	A (0.00)	44	G (1.00)	A (0.00)	42	G (1.00)	A (0.00)	N/A	N/A	N/A
rs10427781	C/T	Downstream	-	56	T (1.00)	C (0.00)	44	T (1.00)	C (0.00)	43	T (1.00)	C (0.00)	108	T (0.77)	C (0.23)

รูปที่ 68 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน COMT ที่ระบุตำแหน่งตำแหน่งของไพรมเมอร์

**Exon 1** มีขนาด 158 คู่เบส

Exon-intron boundary มีขนาด 51 และ 180 คู่เบส

12345

1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

COMT\_E1F: accccatcctacctgctgc

-20,841 ccgaccccat cctacctgct gggccccgcg ccgcgccccg caccctgccc  
 -20,791 gccacggcct gcgtccgcca ccggaagcgc cctcctaadc cccgcagcgc  
 -20,741 caccgccatt gccgcatcgc tcgtggggct tctggggcag ctagggtgct  
 -20,691 ccgcccgcgt gcctgcgccg gaccggggcg ggtccagtcc cgggcggggc  
 -20,641 gtgcgaggag aggtgagagc gctggctaga ccggggccga atgcccggcg  
 -20,591 attcggggcg ggggccttca gacctagggt ggaacactgg gataggggtg  
 -20,541 ggggaattcg gaccgctgtg aagtgatctg acgttgggtg ggagtctccg  
 -20,491 gacttggggg ggggaatctg gatgggaact ggggaattcg gaccttgggt

COMT\_E1R: tccgaattccccagttcccatcc

**Exon 2** มีขนาด 91 คู่เบส

Exon-intron boundary มีขนาด 176 และ 149 คู่เบส

12345

1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

COMT\_E2F: gccttctgctgtctctctgagg

-1,541 gggggacact agtagggatg tcccttggcc tctctgaggc cttctgctgt  
 -1,491 ctctctgag gccggaaagg cgaagcactg ccctcgccct gctagggagg  
 -1,441 gctcaggcca ggctggccct atccggggaa ggggctcagg tatctggacc  
 -1,391 ttggtcatcg ccaggtagg gtttatgttg atgattatcc aaaggcaaaa  
 -1,341 ttgatttcca cagaaataac atctgctttg ctgccgagct cagaggagac  
 -1,291 cccagacccc tcccgcagcc agagggctgg agcctgctca gaggtgcttt  
 -1,241 gaaggtgagt tggccaacgg aagccggggc agtgccaggg tgggtacaga  
 -1,191 ttccggcccg gtgcatgggc acaggtctgc tgagcacatg tccactctgc  
 -1,141 ctgtgtaaat aggcacatg gcctgaaatc ccctagaagc ctgggtgccc  
 -1,091 catgacctcc ccctagggcg gagcctctgc ttccctgttc tctctgctc

COMT\_E2R: atgcggacaccaggcttctagg

**Exon 3** มีขนาด 289 คู่เบส

Exon-intron boundary มีขนาด 84 และ 89 คู่เบส

12345

1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

COMT\_E3F: gatggtggcactccaagcaaag

-91 aggggggat ggtggcactc caagcaaagg ggcgtgtggg tgetgcagga  
 -41 ggagcacaga gcaactggcgc ccctcccctc ccgccctgca gATGCCGGAG  
 +10 GCCCCGCCTC TGCTGTTGGC AGCTGTGTTG CTGGGCCTGG TGCTGCTGGT  
 +60 GGTGCTGCTG CTGCTTCTGA GGCACCTGGG CTGGGGCCTG TGCCTTATCG  
 +110 GCTGGAACGA GTTCATCCTG CAGCCCATCC ACAACCTGCT CATGGGTGAC  
 +160 ACCAAGGAGC AGCGCATCCT GAACCACGTG CTGCAGCATG CGGAGCCCGG  
 +210 GAACGCACAG AGCGTGCTGG AGGCCATTGA CACCTACTGC GAGCAGAAGG  
 +260 AGTGGGCCAT GAACGTGGGC GACAAGAAAAG GTGGGGTCCG GGCCAGCAGG  
 +310 TGCTCAGCTC TGGGACAGGG ACCCAGGACC AGGCATCAAA GCCCTTACAG  
 +360 GAGAAGCTGT TATCACCCCA TTTCAGGGG GCTGGGAACC CTGGGATATG

COMT\_E3F: ggggtgataacagcttctcctgt

**Exon 4** มีขนาด 194 คู่เบส

Exon-intron boundary มีขนาด 58 และ 106 คู่เบส

12345

1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

COMT\_E4F: tccaagttcccctctctccacct

+960 GGTGGGGGGC CGTGCCTGGG GATCCAAGTT CCCCTCTCTC CACCTGTGCT  
 +1,010 CACCTCTCCT CCGTCCCCAA CCCTGCACAG GCAAGATCGT GGACGCCGTG  
 +1,060 ATTCAGGAGC ACCAGCCCTC CGTGCTGCTG GAGCTGGGGG CCTACTGTGG  
 +1,110 CTACTCAGCT GTGCGCATGG CCCGCTGCT GTCACCAGGG GCGAGGCTCA  
 +1,160 TCACCATCGA GATCAACCCC GACTGTGCCG CCATCACCCA GCGGATGGTG  
 +1,210 GATTTGCTG GCGTGAAGGA CAAGGTGTGC ATGCCTGACC CGTTGTCAGA  
 +1,260 CCTGGAAAAA GGGCCGGCTG TGGGCAGGGA GGGCATGCCG ACTTTGTCCT  
 +1,310 CCCACCAAGG TGTTACACAC ACGTTCACTG AAAACCCACT ATCACCAGGC

COMT\_E4R: cagtgaacgtggtgtgaacacct

**Exon 5** มีขนาด 132 คู่เบส

Exon-intron boundary มีขนาด 216 และ 326 คู่เบส

12345

1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

COMT\_E5F1: tctcacagctctgggtaaactgcc

+1,410 AGTGAGGGTC TCACAGCTCT GGGTAAACTG CCAAGGTGGC ACCAGGAGGG  
+1,460 GCAGGGACAG AGTGGGGCCT TGTCATCCCA GAACCTAAA GAAACTGAT  
+1,510 GAATGCTTGT ATGGGTGTGT AAAGATGGCC TCCTGTCTGT GTGGGCGTGG  
+1,560 GCACTGACAG GCGCTGTTGT ATAGGTGTGT AGGGATGGCC TCCTGTCTGT  
+1,610 GAGGACGTGG GCACTGACAG GCGCTGTTCC AGGTCACCCT TGTGGTTGGA  
+1,660 GCGTCCCAGG ACATCATCCC CCAGCTGAAG AAGAAGTATG ATGTGGACAC  
+1,710 ACTGGACATG GTCTTCCTCG ACCACTGGAA GGACCGGTAC CTGCCGGACA  
+1,760 CGCTTCTCTT GGAGGTGAGC CCAACCAGG ATGGCATCCG TGCCAGCTGC  
+1,810 TGCCAGAGC CCATTCAGTC AGCCTCAGCC TCTCCAAAGA GCCAGGCATT  
+1,860 CCAGTAGAGC CCTGTGTGGA CACAGCTCGC TCTGGAGGCA CCACCTGAGG  
+1,910 TCTGGGAGTG TGGGGGACTG AGGAGGCCCT GTGGTGGGTG GAGATGGGTG  
+1,960 GGGAGCTGGG CCAGGGGCCCT GGCTGGGTGG CCTGTGGGA ACTGGGGAGC  
+2,010 CAGCTGCCTG TGCAGGTGCA AAATGGGTGG CAGAAGTGGG GTGCACACCC  
+2,060 CAGACCAGAC ACCAGGCGAG AAACGGCACA GGACCAAGGA GATGGGGTGG

COMT\_E5R2: tccttggtcctgtgacgtttctgc

**Exon 6** มีขนาด 472 คู่เบส

Exon-intron boundary มีขนาด 65 และ 66 คู่เบส

12345

1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

COMT\_E6F: ggtttggggcaggttctctgggac

+5,910 CGTGGTGCCG TGGCCTAGTG AGGAGCACCC ATCCTGGTTT GGGGCAGGTT  
+5,960 CTCTGGGCAC CTCTGACCCT CACCTCCCC ACCCCCCGGT CTGTTTGCAG  
+6,010 GAATGTGGCC TGCTGCGGAA GGGGACAGTG CTA CTGGCTG ACAACGTGAT  
+6,060 CTGCCCAGGT GCGCCAGACT TCCTAGCACA CGTGCGCGG AGCAGCTGCT  
+6,110 TTGAGTGCAC ACACTACCAA TCGTTCCCTGG AATACAGGGA GGTGGTGGAC  
+6,160 GGCCCTGGAGA AGGCCATCTA CAAGGGCCCA GGCAGCGAAG CAGGGCCCTG  
+6,210 Actgcccccc cggccccct ctcgggctct ctcaccacagc ctggtactga  
+6,260 aggtgccaga cgtgctcctg ctgaccttct gcggtccgg gctgtgtcct  
+6,310 aatgcaaag cacacctcg cggaggcctg cgccctgaca tgctaaccct  
+6,360 tctgaactgc aacctggat tgttcttttt taagactcaa tcatgacttc  
+6,410 tttactaaca ctggctagct atattatctt atataactaat atcatgtttt  
+6,460 aaaaatataa aatagaaatt a  
+6,481 agaactctaaa tatttagata taactcgact tagtacatcc tctcaactg  
+6,531 ccattccccct gctgccccttg acttggggac caaacattca aagctccccct

COMT\_E6R: gttgacggtaaggggacgacggg

## ภาคผนวก ข

10 mM Ammonium acetate (50 ml)		
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (77.08)	38.54	g
Deionized distilled water	50	ml
25% Ammonium persulfate (1 ml)		
APS	0.25	g
Deionized distilled water	1	ml
2.5 mM dNTPs Mix (400 µl)		
100 mM dATP	10	µl
100 mM dCTP	10	µl
100 mM dGTP	10	µl
100 mM dTTP	10	µl
Deionized distilled water	360	µl
Mix well, store at -20 °C		
2.5 mM dNTPs Mix with 50% 7-Deaza-dGTP (400 µl)		
100 mM dATP	10	µl
100 mM dCTP	10	µl
100 mM dTTP	10	µl
100 mM dGTP	5	µl
10 mM 7-deaza-dGTP	50	µl
Deionized distilled water	315	µl
Mix well, store at -20 °C		
0.5 M EDTA (pH 8.0) (1000 ml)		
EDTA (FW = 372.24)	186.12	g
Deionized distilled water	1000	ml
pH to 8.0 using NaOH		
Elution buffer (40 ml)		
10 mM Ammonium acetate	2.5	ml



Sodium Acetate (3M, pH 5.2)	136	μl
0.5 mM EDTA (pH 8.2)	80	μl
Deionized distilled water up to 40 ml		
Loading dye (for electrophoresis)		
Bromophenol Blue	0.25%	
Glycerol	30%	
1 M MgCl <sub>2</sub> (1000 ml)		
MgCl <sub>2</sub>	203.31	g
Deionized distilled water	1000	ml
10% SDS (50 ml)		
SDS	5	g
Deionized distilled water	50	ml
3 M Sodium Acetate, pH5.2 (100 ml)		
NaOAc*3H <sub>2</sub> O	40.8	g
Deionized distilled water	100	ml
Solution A (400 ml)		
5M NaCl	11.2	ml
1M Tris-HCl, pH 8.0	4	ml
1M MgCl <sub>2</sub>	0.6	ml
NP-40	0.4	ml
Deionized distilled water up to 400 ml		
50XTAE (1,000 ml)		
Tris base	242.28	g
Glacial acetic acid	57.1	ml
EDTA	18.61	g
Deionized distilled water to 1,000 ml, store at 4 °C		
10X TBE (1,000 ml)		
Tris base	109.03	g
Boric acid	55.65	g
EDTA	7.45	g
Deionized distilled water up to 1,000 ml, store at room temperature		

## TE buffer (1000 ml)

1M Tris-HCl, pH 8.0	10	ml
---------------------	----	----

0.5 mM EDTA, pH 8.0	2	ml
---------------------	---	----

Deionized distilled water up to 1000 ml

## 1 M Tris-HCl, pH 8.0 (1000 ml)

Tris (FW 121.4 g/mol)	121.14	g
-----------------------	--------	---

Deionized distilled water	1000	ml
---------------------------	------	----

pH to 8.0 using HCl

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวรทัย ไหมศรีขาว	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5110220069	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2548

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

กองทุนวิจัยคณะแพทยศาสตร์

ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษาของ สกว กับ สกอ

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ทุนหลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Maisrihew, W., Praphanphoj, V., Worachotekamjorn, J., Hansakunachai, T., Roongpraiwan, R., Somboontham, T., Ruangdaraganon, N., Sripo, T. and Limprasert, P. 2010. Chromosomal abnormality screening in Thai children with Autism Spectrum Disorders. Proceeding of the 2<sup>nd</sup> Thailand Research Symposium of Thailand Research Expo 2010 The Office of National Research Council of Thailand (NRCT), August 26-30, 2010. pp. 110-111.

Maisrihew, W., Praphanphoj, V., Worachotekamjorn, J., Hansakunachai, T., Roongpraiwan, R., Somboontham, T., Ruangdaraganon, N., Sripo, T. and Limprasert, P. 2010. Mutation screening of the COMT gene in Thai children with autism spectrum disorders. Abstract of 26<sup>th</sup> Faculty of Medicine Research Conference. Prince of Songkla University, August 4-6, 2010. pp. 168-169.