

การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดของ hemoglobin Bart's hydrops fetalis จากน้ำคร่ำโดยใช้ real-time gap-PCR และ high resolution DNA melting analysis

พีระพล วงษ์<sup>1\*</sup>, กรนันท์ คำหล้า<sup>1</sup>, ปริศนา เจริญพร<sup>1</sup>, แนนงน้อย เจริญนิม<sup>1</sup>, รัตน์ชนก กันต์<sup>1</sup>, เอกอมร เทพพรหม<sup>1</sup>, รวิสุต เตียววิศเรศ<sup>1</sup> และ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี<sup>2</sup>

Prenatal diagnosis for Bart's hydrops fetalis using real-time gap-PCR and high resolution DNA melting analysis from amniotic fluid

Peerapon Wong<sup>1\*</sup>, Koranan Chumla<sup>1</sup>, Prissana Charoenporn<sup>1</sup>, Nangnoi Jermnim<sup>1</sup>, Ratchanok Kande<sup>1</sup>, Akamon Tapprom<sup>1</sup>, Rawisut Deoisares<sup>1</sup>, Torpong Sanguanserm<sup>2</sup>

<sup>1</sup>หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก <sup>2</sup>ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

<sup>1</sup>Thalassemia Research Unit, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok Province. <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai Province.

\*Corresponding author. E-mail: [peeraponw@nu.ac.th](mailto:peeraponw@nu.ac.th)

บทคัดย่อ

คู่สามีภรรยาที่เสี่ยงต่อการได้บุตรเป็น homozygous alpha thalassemia-1 พบได้บ่อยในเขตภาคเหนือตอนล่าง การศึกษานี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อทดสอบความสะดวก และแม่นยำของการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดของ alpha thalassemia-1 โดยใช้ real-time gap-PCR ด้วย SYTO9 และ high resolution DNA melting (HRM) analysis จากน้ำคร่ำ การศึกษาทำโดยรวบรวมหญิงตั้งครรภ์พร้อมทั้งสามีที่เป็นคู่เสี่ยงทั้งหมด 12 คู่ เพื่อตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดจากน้ำคร่ำ โดยทำการตรวจ alpha thalassemia-1 allele ชนิด Southeast Asian และ allele ปกติ โดยใช้ real-time gap-PCR ด้วย SYTO9 และ HRM analysis จากตัวอย่าง DNA ทั้งสิ้น 36 ตัวอย่าง เป็นน้ำคร่ำ 12 ตัวอย่าง และเลือดของหญิงตั้งครรภ์และสามีอีก 24 ตัวอย่าง (12 ครอบครัว) การตรวจดังกล่าวทำคู่ขนานไปกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานเดิมที่ใช้ gap-PCR แล้วตามด้วย gel electrophoresis พร้อมทั้ง VNTR assay เพื่อหาการปนเปื้อน DNA จากมารดา เส้นกราฟของ alpha thalassemia-1 allele และ allele ปกติ จาก HRM analysis ให้จุดสูงสุดของ Tm ที่  $90.37 \pm 0.13$  องศาเซลเซียส และ  $93.78 \pm 0.16$  องศาเซลเซียส ตามลำดับ พาหะของ alpha thalassemia-1 ให้กราฟที่มีจุดสูงสุดของ Tm เป็นสองยอด ขณะที่ homozygote ให้กราฟที่มีจุดสูงสุดของ Tm เพียงยอดเดียว แล้วแต่ชนิดของยีน (genotype) ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลสอดคล้องกันทั้งสองวิธี ไม่พบการปนเปื้อน DNA จากมารดาในทั้งสองวิธี เมื่อคำนึงถึงความสอดคล้องกันของผลการตรวจดังกล่าวประกอบกับความสะดวกรวดเร็ว และค่าใช้จ่ายของการตรวจด้วยวิธีใหม่เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานเดิม จึงควรให้มีการเปลี่ยนแปลงการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดของ alpha thalassemia-1 ในปัจจุบัน

คำสำคัญ: real-time gap-PCR, high resolution melting analysis, alpha thalassemia, การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

Abstract

Couples at risk for having a child with homozygous alpha thalassemia-1 are prevalent in lower northern Thailand. To report the feasibility and accuracy of real-time gap-PCR with SYTO9 and high resolution DNA melting (HRM) analysis in prenatal diagnosis (PND) of alpha thalassemia-1 from amniotic fluid, twelve at risk pregnancies with their spouses were consecutively recruited to carry on PND with amniotic fluid sampling. Real-time gap-PCR with SYTO9 and HRM analysis was performed in 36 DNA samples from 12 amniotic fluids and 24 at risk couples' bloods (12 families) to determine the alpha thalassemia-1 (Southeast Asian type) and normal allele. The tests were conducted in parallel with conventional gap-PCR followed by gel electrophoresis for alpha thalassemia-1 and VNTR assay for maternal DNA contamination. The dissociation curve analysis of alpha thalassemia-1 and normal alleles showed a peak of Tm at  $90.37 \pm 0.13^\circ\text{C}$  and  $93.78 \pm 0.16^\circ\text{C}$  respectively. Heterozygotes gave double peaks of Tm while homozygotes and normal samples resulted in single peak corresponded to their genotypes. All samples showed consistent results with conventional gap-PCR. There were no maternal DNA contaminations detected in both methods. These concordant data, together with cost-effectiveness benefit of this new intervention, worth reforming routine alpha thalassemia-1 PND.

**Keywords:** real-time gap-PCR, high resolution melting analysis, alpha thalassemia, prenatal diagnosis