

## บทความพิเศษ

# การตรวจแอนติเจน HLA : การตรวจระดับ High Resolution ด้วย Microbeads Array Technique

อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์

คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### ความสำคัญของแอนติเจน HLA

แอนติเจน Human Leucocyte antigen (HLA) หรือที่เรียกว่า Major Histocompatibility complex (MHC) มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการแยกแยะตัวเอง (self) และสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย (non-self) ของกระบวนการรับรู้ของ immune cell แอนติเจน HLA จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการปลูกถ่ายอวัยวะ เนื่องจากแอนติเจน HLA ของบุคคลหนึ่งย่อมเป็นสิ่งแปลกปลอมสำหรับอีกบุคคลหนึ่ง ดังนั้นในการปลูกถ่ายอวัยวะ ถ้าสามารถเลือกแอนติเจน HLA ระหว่างผู้ให้และผู้รับให้เหมือนกันมากที่สุด โอกาสเกิดการต่อต้านสิ่งปลูกถ่ายจากร่างกาย (graft rejection) หรือภาวะ การต่อต้านร่างกายจากสิ่งปลูกถ่าย (graft versus host) จะน้อยลง โดยเฉพาะการปลูกถ่ายไขกระดูก หรือ stem cell การคัดเลือกไขกระดูกเพื่อการปลูกถ่าย มักสืบค้นในพื้นที่ร่วมบิดามารดา เพราะโอกาสการพบ HLA ที่เหมือนกัน (identical sibling) ประมาณร้อยละ 25 แต่เนื่องจากในปัจจุบันจำนวนสมาชิกพี่น้องในครอบครัวเล็กลง ทำให้โอกาสการพบ identical sibling ลดน้อยตาม จึงต้องคัดเลือกจากประชากรทั่วไป (unrelated donor) ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการตรวจแอนติเจน HLA ให้ได้ผลที่ถูกต้อง สามารถคัดเลือกอวัยวะได้เหมาะสม การปลูกถ่ายจึงจะมีผลสำเร็จสูง

ได้รับต้นฉบับ 30 มิถุนายน 2550 ให้ลงตีพิมพ์ 2 สิงหาคม 2550  
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ.อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์ คลังเลือดกลาง  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 65000

### ชนิดของแอนติเจนและวิธีทดสอบ

นับตั้งแต่มีการค้นพบแอนติเจน HLA มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1954<sup>1</sup> ได้มีการพัฒนาการตรวจหาแอนติเจน HLA ด้วยวิธีซีโรโลยี โดยอาศัยปฏิกิริยา microlymphocytotoxicity test กล่าวคือให้เซลล์ ลิมโฟไซต์ที่มีแอนติเจน HLA ทำปฏิกิริยากับแอนบอดี HLA ชนิดต่างๆ โดยมีคอมพลีเมนต์ร่วมด้วย ถ้าแอนติเจนมีความจำเพาะตรงกับแอนติบอดี จะเกิดปฏิกิริยาทำให้เซลล์ตาย โดยวิธีซีโรโลยี สามารถพบแอนติเจน HLA-A จำนวน 28 ชนิด HLA-B จำนวน 59 ชนิด HLA-C จำนวน 10 ชนิด และ HLA-DR จำนวน 21 ชนิด<sup>2</sup> วิธีซีโรโลยีนี้มีข้อจำกัดบางประการเช่น แอนติซีรัมที่มีความไวและความจำเพาะสูงหาได้ยาก ไม่สามารถหาแอนติบอดีได้ครบทุกชนิด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดไว้ได้ต้องทดสอบทันที

### ชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนและการทดสอบ

ยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจน HLA อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6 มีความยาวประมาณ 4,000 กิโลเบส นับเป็นยีนที่มีความหลากหลายสูงมากที่สุดของมนุษย์ ในบรรดาแถบยีนขนาดนี้มากกว่า 5,000 กิโลเบส จากรายงานในต้นปี 2007<sup>3</sup> พบอัลลีลของยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจน HLA -A จำนวน 506 ชนิด HLA-B จำนวน 851 ชนิด HLA-Cw จำนวน 276 ชนิด HLA-DRB1 จำนวน 477 ชนิด HLA-DQB1 จำนวน 81 ชนิด และ HLA-DPB1 จำนวน 120 ชนิด ดังนั้นหลังจากที่มีการค้นพบปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase chain

reaction (PCR) โดย Saiki ในปี 1985<sup>4</sup> จากนั้น 4 ปี ต่อมาจึงมีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหา ยีน HLA ได้แก่ PCR- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)<sup>5,6</sup>, PCR -single-strand conformational polymorphisms (PCR-SSCP)<sup>7,8</sup>, PCR-sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP)<sup>9,10</sup>, PCR-sequence specific primers (PCR-SSP)<sup>11,12</sup>, direct sequencing<sup>13,14</sup> วิธี molecular ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ แต่วิธีเหล่านี้ก็มีข้อจำกัดบางประการหรือหลายประการเช่น มีหลายขั้นตอน ใช้เวลาการทดสอบนาน ทดสอบตัวอย่างได้ที่ละน้อย ราย (Low throughput) ค่าใช้จ่ายสูง สามารถตรวจหา ยีนได้ในระดับกลุ่มของอัลลีล (low resolution) เช่น A\*02 จนถึงระดับชนิดของอัลลีล (high resolution) เช่น A\*0201 หลักการของแต่ละวิธีสามารถอ่านได้จาก บทความ "Histocompatibility testing" ที่ได้มีการนำเสนอไว้ในวารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต ปีที่ 14 ฉบับที่ 3, 2547 ดังนั้นในการคัดเลือกไขกระดูก หรือ stem cell จาก unrelated donor เพื่อการปลูกถ่าย ต้องใช้การทดสอบ HLA ที่มี high resolution สามารถทดสอบได้ถึงระดับอัลลีล (4 digits) ทั้งนี้เพื่อให้ แอนติเจน HLA มีความเหมือนกันมากที่สุด

ในการทดสอบหาชนิดของยีน เทคนิค sequence base typing นับว่าเป็น Gold standard ในการตรวจหา และยืนยันชนิดของยีน แต่เทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัดในการทดสอบคือ สามารถทดสอบได้ครั้งละน้อยตัวอย่าง (Low throughput) ใช้เวลานาน ที่สำคัญมีค่าใช้จ่ายสูง และบางครั้งไม่สามารถบอก heterozygous alleles ที่ชัดเจนได้ จึงได้มีผู้พัฒนาเอาเทคนิค polymerase chain reaction- sequence specific probes (PCR-SSO) มาใช้ร่วมกับ เครื่อง Flow cytometry ในรูปแบบของ Microsphere-based suspension array เพื่อลดข้อจำกัดของวิธี PCR-SSOP ดังนั้นเทคนิค Microsphere-based suspension array จึงเป็นเทคนิคที่มี

ความจำเพาะ สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาน้อยสามารถทดสอบได้ครั้งละมากๆ (high throughput) และสามารถตรวจหา ยีนได้ในระดับ high resolution

### การทดสอบหา ยีน ด้วยวิธี **Microsphere-based suspension array (Luminex technology)**<sup>15,16</sup>

ใช้หลักการพื้นฐานของ PCR-SSO โดยใช้ specific oligonucleotide probes เคลือบ บนเม็ด bead แทน การเคลือบบนแผ่น membrane และตรวจวัดปฏิกิริยา ด้วยเครื่อง Flowcytometer (Luminex) ซึ่งจะวัด สียฟลูออเรสเซนซ์ การตรวจวัดสีมี 2 แบบ ประกอบด้วย

1. การตรวจวัดสีฟลูออเรสเซนซ์ของเม็ด bead (bead identification)

เม็ด bead ที่ใช้เป็น polystyrene microsphere ที่มีขนาดประมาณ 5.5 ไมครอน ซึ่งจะถูกเคลือบสีภายใน เม็ด bead ด้วย สียฟลูออเรสเซนซ์ 2 สี (red and infra-red) ที่มีสีต่างกันแตกต่างกัน ดังนั้นใน 1 หลอด หรือ 1 array สามารถผสมเม็ด beads ได้ถึง 100 ชนิดที่มีความเข้มของสีต่างกัน ดังรูปที่ 1 จากนั้นทำการเชื่อม probe แต่ละชนิดบนเม็ด bead แต่ละสี นั่นคือใน 1 หลอดของการทดสอบ จะมี specific probes ที่ต่างกันถึง 100 ชนิด

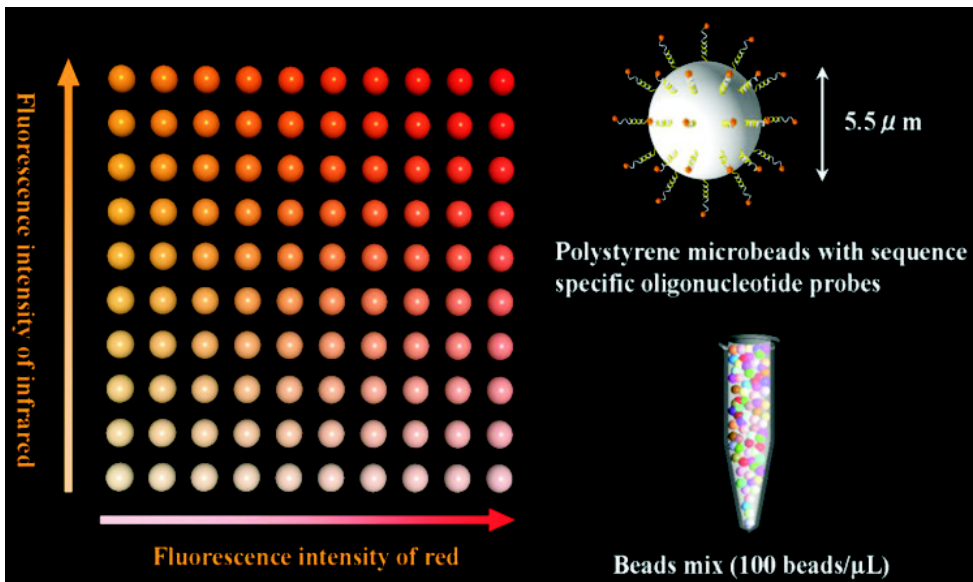
2. การตรวจวัดสีฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดปฏิกิริยา จำเพาะบนเม็ด bead (reporter identification)

เมื่อทำการเพิ่มขยายยีนแล้ว นำ amplicon มาทำปฏิกิริยากับ microbeads array ที่ถูกติดฉลากด้วย specific probe ส่วนของ amplicon จะจับกับ probe ที่จำเพาะกัน จากนั้นติดฉลากสีฟลูออเรสเซนซ์กับ amplicon ที่อยู่บนเม็ด beads ทำการวัดสีฟลูออเรสเซนซ์บนเม็ด bead

### ขั้นตอนการทำ **PCR-SSOP-Luminex method**

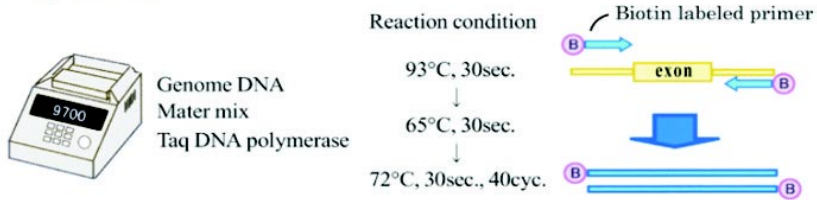
ประกอบด้วยขั้นตอน ดังรูปที่ 2

1) **PCR amplification** ทำการเพิ่มขยายยีน HLA ในส่วนของ exon ของแต่ละ loci โดยใช้ specific primers ที่ปลายด้าน 5' ติดฉลากด้วย biotin ได้

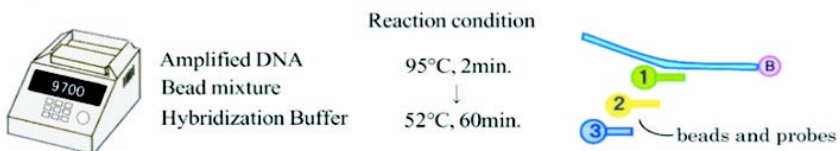


รูปที่ 1 แสดงสัดส่วนความเข้มข้นของสีฟลูออเรสเซนต์ภายใน microbead (จาก Itoh, et al, 2005)

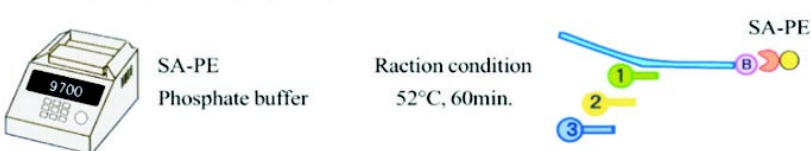
< Amplification >



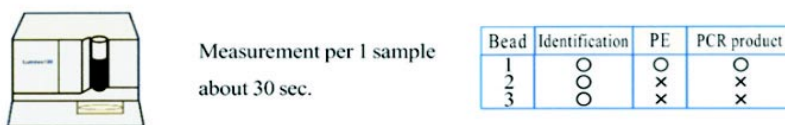
< Hybridization >



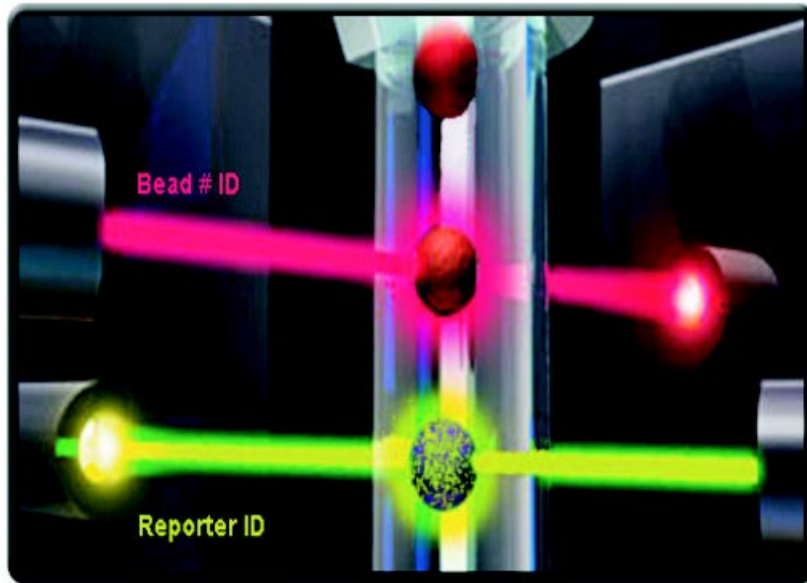
< SA-PE (Streptavidin-phycoerythrin) Reaction >



< Measurement >



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการทดสอบ PCR-SSOP-Luminex (จาก Itoh, et al, 2005)



**รูปที่ 3** แสดงแสงเลเซอร์ 2 ชนิด ชนิดแรก (635 nm) จะทำการตรวจสีฟลูออเรสเซนต์ภายในเม็ด bead (bead ID) แสงเลเซอร์ชนิดที่สอง (532 nm) จะตรวจหาสีฟลูออเรสเซนต์ที่อยู่บน amplicon (reporter ID)

(จาก <http://www.upstate.com>)

amplicon ที่จำเพาะของยีน

**2) Hybridization** นำ amplicon ที่ได้มา denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เพื่อให้ได้ DNA สายเดี่ยว จากนั้นนำไป hybridized กับ specific probes ชนิดต่างๆ ที่ถูก label อยู่บน microbeads ส่วนของ amplicon ที่มีความจำเพาะกับ probe ได้ ก็จะเข้าจับแบบ complementary กันกับ probe นั้นๆ

**3) Streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) reaction** เติมน้ำยา SA-PE เพื่อให้สีฟลูออเรสเซนต์เข้าไปจับกับสาร biotin-amplicon บน probe

**4) Measurement** เป็นขั้นตอนการวัดผลโดยใช้เครื่อง Luminex อาศัยหลักการของ Flowcytometer ดังรูปที่ 3 กล่าวคือ เครื่องจะมีแสงเลเซอร์ 2 ชนิด ชนิดแรก (635 nm.) จะทำการตรวจสีฟลูออเรสเซนต์ภายในเม็ด bead เพื่อสามารถบอกได้ว่าเม็ด bead ที่กำลังเคลื่อนตัวผ่านแสงนั้น มีความเข้มของสีแบบใด หรืออีกนัยหนึ่งเป็น probe ชนิดใด แสงเลเซอร์ชนิดที่สอง (532

nm.) จะตรวจหาสีฟลูออเรสเซนต์ที่อยู่บน amplicon เพื่อดูว่าบน bead นั้นมี amplicon อยู่หรือไม่ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปแปลผลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ สามารถบอกได้ว่าในตัวอย่างทดสอบนั้นมียีน HLA ชนิดอะไรบ้าง เครื่อง Luminex จะทำงานได้เร็วมาก สามารถวัดสีในปฏิกิริยา 1 หลอด (beads 100 ชนิด) ได้ภายใน 30 วินาที

เทคนิค **Microsphere-based suspension array** หรือ PCR-SSOP-Luminex method สามารถตรวจหาชนิดของยีนได้ในระดับ high resolution (4 digits) เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้สะดวก รวดเร็วมาก สามารถทดสอบพร้อมกันได้ทีละ 96 arrays ในลักษณะของ 96 wells microplate ทำให้ตรวจวัด HLA-A, -B, -C, -DR จำนวน 100 ตัวอย่างได้ภายใน 5 ชั่วโมง โดยใช้บุคลากรเพียง 1 คน ต่างจากเทคนิค PCR-SSP ที่ใช้เวลาถึง 2.5 ชั่วโมงต่อ 1 ตัวอย่าง ปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูปจำหน่ายอย่างน้อย 2 บริษัท การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิด

ของประชากรนั้นๆ เพราะแต่ละประชากรจะมียีน HLA ที่หลากหลายและแตกต่างกัน ต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมจึงจะได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและแม่นยำ

### เอกสารอ้างอิง

1. Dausset H. Leukoagglutinins. IV. Leukoagglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 1954;4:190.
2. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 2005;65:301-69.
3. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>.
4. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
5. Ota M, Seki T, Fukushima H, Inoko H, et al. HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* 1992;39:187-202.
6. Olerup O. HLA class typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens* 1990;36: 83-7.
7. Bannai M, Tokunaga K, Juji T, et al. HLA-B40, B18, B27, and B37 allele discrimination using group-specific amplification and SSCP method. *Hum Immunol* 1996;46:107-13.
8. Teraoka Y, Ozawa A, Inoko H, et al. Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1 telomeric of the HLA-C gene and lack of association of psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 2000;55:206-11.
9. Mizuki N, Ohno S, Tsuji K, Inoko H, et al. PCR-RFLP is as sensitive and reliable as PCR-SSO in HLA class II genotyping. *Tissue Antigens* 1992;40:100-3.
10. Levine JE, Yang S. SSOP typing of the Tenth International Histocompatibility Workshop reference cell lines for HLA-C alleles. *Tissue Antigens* 1994;44: 174-3.
11. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DRB1\*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991;37:197-204.
12. Ando H, Mizuki N, Ando R, Miyata Y, Miyata S, Wakisaka K, Inoko H. HLA-C genotyping in the Japanese population by the PCR-SSP method. *Tissue Antigens* 1996;48:55-8.
13. Santamaria O, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, et al. HLA class I sequence-based typing. *Hum Immunol* 1993;37:39-50.
14. Ramon D, Marincola FM, Wang L, et al. Pyrosequencing trade mark : A one-step method for high resolution HLA typing. *J Transl Med* 2003;26:9.
15. Dunbar SA, Vander Zee CA, Jacobson JW, et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J Microbiol Methods* 2003;53:245-52.
16. Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, Azuma F, Itakura M, Kashiwase K, Kikkawa E, Kulski JK, Satake M, Inoko H. High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics* 2005;57: 717-29.

