TRG5080002 ดร.วรรณรัตน์ แซ่ชั่น

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย

โดย

ดร. วรรณรัตน์ แซ่ชั่น	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ศ.นพ .สุทัศน์ ฟู่เจริญ	สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา
ผศ .ดร .จำนงค์ นพรัตน์	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
นางชวดี นพรัตน์	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

H35

เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2552

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5080002

ชื่อโครงการ : การศึกษาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย

คณะผู้วิจัย : วรรณรัตน์ แซ่ชั่น (ดร.)[1], สุทัศน์ ฟู่เจริญ (ศ.นพ.)[2], จำนงค์ นพรัตน์ (ผศ .ดร.)[1], และ ชวดี นพรัตน์[1](ปร.ม)

1 : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2 : สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

E-mail Address : svannarat2002@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (2 กรกฎาคม 2550 – 1 กรกฎาคม 2552)

ฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นภาวะทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา เกิดขึ้นเนื่องจากยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเปปไทด์ผิดปกติไปมีผลทำให้มีความผิดปกติในแง่คุณภาพของฮีโมโกลบิน มีรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทยแล้วมากกว่า 14 ชนิด ปัจจุบันวิธีการที่ใช้ในการศึกษาหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกตินั้นได้ใช้เครื่องตรวจวัดชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง ซึ่งยังมีฮีโมโกลบินผิดปกติอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธีนี้ และปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆกับความรุนแรงของโรค เพื่อช่วยให้ทราบถึงความรุนแรงของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดที่พบต่อประชากรในภาคใต้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาจึงเน้นพัฒนาวิธีการตรวจหาความผิดปกติของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยการตรวจวิเคราะห์ถึงระดับดีเอ็นเอ เพื่อที่จะทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์ ชนิดและความรุนแรงของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิด และจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการป้องกัน ควบคุมและตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ก่อให้เกิดโรคฮีโมโกลบินผิดปกติร่วมกับโรคธาลัสซีเมียที่อาจก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อยจำนวน 58 ราย นำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีนเบต้าหรือแอลฟ่าโกลบินโดยการทำพีซีอาร์ และตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยการตรวจหาลำดับเบสของตัวอย่างดีเอ็นเอ และวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ผลจากการศึกษาสามารถตรวจพบความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินชนิดซี (Hb C) 28 ราย ฮีโมโกลบินชนิด D Panjab 12 ราย ฮีโมโกลบินชนิดตาก (Hb Tak) 7 ราย ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar 4 ราย ฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Hollandia 2 ราย ฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand 2 ราย ฮีโมโกลบินชนิด O-Indonesia 2 ราย และฮีโมโกลบินชนิด Hope 1 ราย นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ยังได้นำไปสู่การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดให้กับคู่สามี-ภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบินชนิดซี 2 ราย ผลการตรวจพบว่าทารกทั้ง 2 รายให้ผลปกติ และตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดให้กับคู่สามี-ภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตรมียีนฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar ร่วมกับฮีโมโกลบินชนิดอี 1 ราย ผลการตรวจพบว่าทารกเป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar

คำหลัก : ฮีโมโกลบินผิดปกติ, เทคนิควิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น, ภาคใต้ของประเทศไทย

Abstract

Project Code : TRG5080002

Project Title : Molecular analysis of abnormal hemoglobin in southern Thailand

Investigator : Vannarat Saechan (Ph.D)[1], Suthat Fucharoen (Prof.)[2], Chamnong Nopparatana (Assist. Prof.)[1], Chawadee Nopparatana (MSc.)[1]

1 : Faculty of Medicine, Prince of Songkla University

2 : Thalassemia Research Center and Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University

E-mail Address : svannarat2002@yahoo.com, vannarat.s@psu.ac.th

Project Period : 2 years (2 July 2007 – 1 July 2009)

Hemoglobinopathy (abnormal hemoglobin or hemoglobin variant) is an inherited disorder that results in abnormal structure of globin chains of the hemoglobin (Hb) molecule. Many abnormal Hbs have been characterized worldwide, including more than 14 variants in Thailand. The Bio-Rad Variant II HPLC system is used for investigating hemoglobin variants at Songklanagarind Hospital. This system has been shown to be a sensitive, specific and reproducible method, but some Hb variants such as Hb Tak and HbD-Punjab cannot, as yet, be clearly separated by this method. The aim of this study was to investigate the prevalence of hemoglobinopathy in southern Thailand using molecular analysis. A total of 58 abnormal Hbs were obtained from blood samples undergoing routine hemoglobin typing at Songklanagarind Hospital. Genomic DNAs were extracted from the samples and the globin genes analyzed using PCR-direct sequencing and reverse dot blot hybridization. The molecular analysis revealed fifty-eight abnormal Hbs: 28 HbC, 12 HbD-Panjab, 7 HbTak, 4 Hb G-Makassar, 2 Hb Lepore-Hollandia, 2 Hb Q-Thailand, 2 Hb O-Indonesia and 1 Hb Hope. During the study, the test was also applied to fetal diagnosis of 2 couples at risk of beta-thalassemia with HbC disease. The result showed normal genotype in both fetuses. Another one couple at risk of Hb G-Makassar with HbE. The result showed fetus with heterozygous of Hb G-Makassar. In conclusion, reverse dot blot hybridization for detection of abnormal hemoglobin is useful for characterization of abnormal hemoglobin types, including prenatal diagnosis of thalassemia with abnormal hemoglobin, which is endemic in Thailand

Keywords: Abnormal hemoglobin; Hemoglobin variant; Reverse dot blot hybridization; Molecular diagnosis; Thailand

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางแสดงชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้ในประเทศไทย 12

ตารางที่ 2 ตารางแสดงไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการด้วยวิธีพีซีอาร์ 16

ตารางที่ 3 ตารางแสดง Amino-linked oligonucleotide probes 17

ตารางที่ 4 ตารางแสดงรายละเอียดของตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติ 18

ตารางที่ 5 ตารางแสดงฮีโมโกลบินผิดปกติที่ตรวจพบ 24

ตารางที่ 6 ตารางสรุปจำนวนและชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย 26

ตารางที่ 7 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติ แต่ละชนิด 37

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ภาพแสดงโครมาโตแกรมของผล Hemoglobin typing	20
ภาพที่ 2	ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด HbD-Panjab	27
ภาพที่ 3	ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด HbG-Makassar	27
ภาพที่ 4	ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด Hb Lepore-Hollandia	28
ภาพที่ 5	ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิดตาก	28
ภาพที่ 6	ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด Hope	29
ภาพที่ 7	ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand	29
ภาพที่ 8	ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด Hb O-Indonesia	30
ภาพที่ 9	ภาพแสดงโครมาโตแกรมของผล Hemoglobin typing เปรียบเทียบกับชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ	31
ภาพที่ 10	ภาพแสดงผลการตรวจฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น	35
ภาพที่ 11	ภาพแสดงผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ของครอบครัว T34588	38
ภาพที่ 12	ภาพแสดงผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ของครอบครัว T34854	39
ภาพที่ 13	ภาพแสดงผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ของครอบครัว T37624	40

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. บทนำ	10
2. วัตถุประสงค์	13
3. วิธีดำเนินการวิจัย	
● ตัวอย่างเลือด	14
● เครื่องมือ	14
● สารเคมีและน้ำยา	14
● วิธีทำ	
1) การตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา	15
2) การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด	15
3) การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีการตรวจหาลำดับเบสโดยวิธีอัตโนมัติ	15
4) การพัฒนาวิธีการตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น	15
4. ผลการวิจัย	18
5. ข้อวิจารณ์	41
6. เอกสารอ้างอิง	44
7. ภาคผนวก	48

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ab	Abnormal
Hb	Hemoglobin
DNA	Deoxyribonucleic acid
ASO	Allele-specific oligonucleotide
RDB	Reverse dot blot
PCR	Polymerase chain reaction
RT	Retention time
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

บทนำ

ฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นภาวะทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา เกิดขึ้นเนื่องจากยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเปปไทด์ผิดปกติไปมีผลทำให้มีความผิดปกติในแง่คุณภาพของฮีโมโกลบิน ปัจจุบันมีรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบทั่วโลกแล้วมากกว่า 850 ชนิด [1] สำหรับในประเทศไทยพบแล้วมากกว่า 14 ชนิด [2-4] โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ ฮีโมโกลบินอี พบโดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 13 ของประชากรทั้งหมด และพบประมาณร้อยละ 11.2 ในผู้หญิงที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ .หาดใหญ่ จ .สงขลา ระหว่างปี พ.ศ. 2537-2538 ปัจจุบันวิธีการที่ใช้ในการศึกษาหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกตินั้นได้ใช้วิธีการ Isoelectric focusing โดยอาศัยหลักการที่ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะมีค่า pI ที่ไม่เท่ากันทำให้สามารถแยกฮีโมโกลบินชนิดต่างๆแยกออกจากกันได้ และอีกวิธีคือการใช้เครื่องตรวจวัดชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดัน HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เป็นเทคโนโลยีใหม่สามารถแยกชนิดและระบุปริมาณของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆได้เป็นอย่างดีถึงแม้ว่าฮีโมโกลบินชนิดนั้นจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม ซึ่งเครื่อง HPLC ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นเครื่องของ Bio-Rad ชื่อ Variant โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นโปรแกรมที่ชื่อ β–thal short program เป็นโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยเบต้า-ธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางด้านการสร้างสายเบต้าโกลบิน ซึ่งได้แก่ HbE, HbS และ HbC ซึ่งมีฮีโมโกลบินผิดปกติอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถแยกได้ด้วย β–thal short program เช่น HbD, Hb Tak, หรือ Hb Lepore แต่เครื่องวิเคราะห์ก็ยังสามารถจะรายงานผลออกมาให้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีฮีโมโกลบินผิดปกติมากกว่าหนึ่งชนิดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยสังเกตได้จาก retention time (RT) ฉะนั้นการวิเคราะห์หาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติโดยวิธีนี้จึงยังมีข้อจำกัดและแปลผลผิดพลาดได้ การวิเคราะห์หาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติในระดับโมเลกุลจึงมีความจำเป็นเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ และยังเป็นการยืนยันผลชนิดของฮีโมโกลบินที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC อีกด้วย วิธีการศึกษาทางโมเลกุลมักใช้วิธีการวิเคราะห์หาลำดับเบส sequencing ซึ่งต้องใช้เครื่องมือ DNA sequencer, น้ำยาที่มีราคาแพง และต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้ความชำนาญในการศึกษา หรือใช้วิธีการ multiplex allele-specific polymerase chain reaction ที่ต้องมีการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ผิดปกตินั้นๆ และสามารถวิเคราะห์หาชนิดความผิดปกติได้เพียง 1 หรือ 2 ชนิดต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละครั้ง แต่เนื่องจากในประเทศไทยมีรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติแล้วมากกว่า 14 ชนิด และมีบางชนิดที่เมื่อแยกด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง HPLC แล้วไม่สามารถระบุชนิดที่แน่นอนได้เนื่องจากฮีโมโกลบินชนิดนั้นๆมีค่า pI และ RT time ที่เท่ากันทำให้มีชนิดฮีโมโกลบินมากกว่าหนึ่งชนิดนั้นถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันดังที่กล่าวข้างต้น เช่น กลุ่มของ Hb Tak และ Hb D-Panjab การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเสนอวิธีการหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยเทคนิครีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น (Reverse dot blot hybridization) ด้วยวิธีนี้จะทำให้สามารถแยกชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติได้ด้วยการทำ hybridization เพียงครั้งเดียว หลักการของเทคนิคนี้จะคล้ายคลึงกับการตรวจวินิจฉัยชนิดเบต้า-ธาลัสซีเมียด้วยเทคนิครีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น [5] ต่างกันที่การออกแบบตัวตรวจจับ (probe) ให้จำเพาะกับกับตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติไปของฮีโมโกลบินที่ผิดปกติแต่ละชนิด ซึ่งยังไม่เคยมีการทำวิจัยมาก่อนในประเทศไทย

นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ยังเป็นการศึกษาถึงอุบัติการณ์ของชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆกับความรุนแรงของโรคด้วย เพื่อช่วยให้ทราบถึงความรุนแรงของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดที่พบต่อประชากรในภาคใต้ และการที่สามารถวิเคราะห์ความผิดปกติได้ถึงระดับโมเลกุลจะช่วยในเรื่องของการป้องกัน ควบคุม และตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ก่อให้เกิดโรคฮีโมโกลบินผิดปกติร่วมกับโรคธาลัสซีเมีย ที่อาจก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคได้

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

จากผลการทบทวนเอกสารที่ตีพิมพ์แล้วทั้งในและต่างประเทศ พบว่าชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบทั่วโลกมากกว่า 850 ชนิด [1] สำหรับในประเทศไทยพบแล้วมากกว่า 14 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งส่วนใหญ่ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบจะเป็นรายงานที่พบในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่วนภาคใต้ของประเทศไทยเลยยังมีการศึกษาถึงชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติจำนวนน้อย ฉะนั้นการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบถึงข้อมูลของชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติได้ครอบคลุมสมบูรณ์ครบทุกภาคของประเทศไทย

ก่อนหน้านี้วิธีการศึกษาเพื่อตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกตินั้นได้มีการศึกษาโดยใช้วิธี monoplex allele-specific PCR และ PCR-RFLP หรือ multiplex allele-specific polymerase chain reaction เช่นในการศึกษาแยกชนิดของ Hb S, Hb D-Punjab และ Hb Tak [3, 4, 6, 7] ซึ่งตำแหน่งของฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งสามชนิดนี้ แสดงออกตำแหน่งเดียวกันเมื่อแยกด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง HPLC การแยกทางโมเลกุลต้องใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะจำนวน 3 คู่เพื่อแยกฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งสามชนิดนี้ออกจากกัน แต่วิธีนี้ไม่สามารถแยกระหว่าง hetertozygous หรือ homozygous ของมิวเตชั่นนี้ได้ด้วยวิธี multiplex allele-specific polymerase chain reaction การศึกษาในครั้งนี้จึงได้นำเอาเทคนิครีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น มาใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติ วิธีนี้จะทำให้สามารถแยกชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติได้ด้วยการทำ hybridization เพียงครั้งเดียว และยังสามารถแยกระหว่าง hetertozygous หรือ homozygous ของมิวเตชั่นแต่ละชนิดได้ หลักการของการตรวจ

สำหรับอาการและความรุนแรงของแต่ละชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติมีความหลากหลายตั้งแต่ไม่แสดงอาการ เช่น ผู้ที่เป็นพาหะของ Hb S, Hb C และ Hb Malay หรือแสดงอาการรุนแรงมากขึ้นมีอาการซีด (anemia) เช่นผู้ที่มียีน Hb C ร่วมกับ Hb Malay [8] แต่เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างอาการกับชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติยังมีรายงานน้อยในประเทศไทย [8-11] ถ้าหากมีข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างอาการกับชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติมากขึ้นก็จะช่วยให้ทราบถึงแนวทางในการป้องกัน รักษา และควบคุมการก่อให้เกิดโรคฮีโมโกลบินผิดปกติที่รุนแรงได้

ตารางที่ 1 ชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้ในประเทศไทย

Abnormal Hemoglobin	gene defect	gene interact	mobility on
Hb Anuntharaj[12]	$\alpha^{11\ Lys->Gln}$	α-globin gene	> A
Hb Siam[13]	$\alpha^{15\ Gly->Arg}$	α-globin gene	< F
Hb Queens[13]	$\alpha^{34\ Leu>Arg}$	α-globin gene	< F
Hb Mahidol[14]	$\alpha^{74\ Asp->His}$	α-globin gene	< A
Hb Suandok[15]	$\alpha^{109\ Leu->Arg}$	α-globin gene	< F
Hb Constant spring[16]	$\alpha^{+31\ amino\ acid}$	α-globin gene	< A
Hb C[17, 18]	$\beta^{6\ Glu->Lys}$	β-globin gene	A2
Hb S[6, 19]	$\beta^{6\ Glu->Val}$	β-globin gene	< F
Hb G Makassar [20, 21]	$\beta^{6Glu>Ala}$	β-globin gene	< F
Hb Siriraj[22]	$\beta^{7-\ Glu->Lys}$	β-globin gene	< F
Hb Malay[8, 23]	$\beta^{19\ Asn->Ser}$	β-globin gene	A
Hb E[2]	$\beta^{26\ Glu->Lys}$	β-globin gene	A2
Hb J-Bangkok[24, 25]	β^{56} Gly->Asp	β-globin gene	>A
Hb Pyrgos[4]	β^{83} Gly->Asp	β-globin gene	>A
Hb D-Punjab[3, 26]	β^{121-} Glu->Gln	β-globin gene	< F
Hb Dhonburi (Neapolis)[27, 28]	β^{126} Val->Gly	β-globin gene	A
Hb Tak[4]	β^{147} Them->Thr	β-globin gene	< F

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น (Reverse dot blot hybridization)
2. เพื่อศึกษาอุบัติการณ์และชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย โดยการศึกษาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติเปรียบเทียบกับวิธี HPLC
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆกับความรุนแรงของโรคโดยเปรียบเทียบค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (blood indicies)

วิธีดำเนินการวิจัย

1) ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่พบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดที่พบได้ไม่บ่อย และเป็นชนิดที่ไม่ใช่ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดฮีโมโกลบินอี ฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง และฮีโมโกลบินเอช จำนวน 45 ราย ได้จากผู้ที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคใต้ของไทย โดยข้อมูลที่ได้มาจากการซักประวัติย้อนกลับไป 2 ชั่วรุ่น (generation) และส่งตรวจหา Hemoglobin typing ณ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย-สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

ตัวอย่างเลือดจำนวน13 ราย จากผู้ป่วยที่เคยทราบว่ามีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดที่พบได้ไม่บ่อย จากการตรวจหา Hemoglobin typing ด้วยวิธี HPLC ในช่วงปี พ.ศ. 2543-2548

2) เครื่องมือ

1. เครื่องตรวจวัดชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง (HPLC, VARIANT®, Bio-Rad, USA)
2. เครื่องนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ (Sysmex® XT2000i; Japan)
3. DNA thermal cycler 480 (Perkin-Elmer, USA)
4. horizontal gel electrophoresis (Mupid, Japan)
5. UV transilluminator (UVP, Inc., USA)
6. Microcentrifuge (TOMY, USA)
7. Shaking water-bath (Julabo, Germany)
8. Avant 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems; Thailand)
9. เครื่องมือและอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็นในงานด้าน molecular biology

3) สารเคมีและน้ำยา ที่สำคัญได้แก่

1. ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Minikit (Blood/Cultured cell) (Geneaid Biotech Ltd; Taiwan)
2. Biotinylated oligonucleotide primers (Biobasic Inc., Canada) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกริยา Polymerase chain (ตารางที่.2)
3. Amino-linked allele-specific oligonucleotide probes (ตารางที่ 3) สำหรับตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบิน โดยวิธี reverse dot blot hybridization ตามที่ได้พัฒนาขึ้น
4. ไนลอนเมมเบรนที่มีประจุลบ (Pall Biodyne C transfer membrane, P/N: BNBCH3R), (Pall BioSupport Division, USA)
5. 1-Ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl (EDC, Sigma E7750)
6. Taq DNA polymerase, Recombinant (Invitrogen, Brazil)

7. Streptavidin-alkaline phosphatase Code: RPN1234 (GE Healthcare Bio-Science Corp, USA
8. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate-p-toluidine salt, BCIP: M41538013 (Molekula, UK)
9. p-Nitro-blue Tetrazolium Chloride, NBT: NDB0379 (Biobasic Inc., Canada)
10. Microcon PCR kit (Millipore Corp., MA, USA)
11. DNA sequencing kit, BigDyeTM terminator cycle sequencing ready reaction (Applied Biosystems, CA, USA).
12. POP™ Polymer (Applied Biosystems, CA, USA).
13. น้ำยาอื่นๆที่จำเป็นในงานด้าน molecular biology

4) วิธีทำ

4.1 <u>การตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา และการตรวจแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน</u>

นำเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA จำนวน 3 มิลลิลิตร มาทำการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาด้วยเครื่องเครื่องนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ (Sysmex® XT2000i; Japan) ซึ่งจะได้ค่าต่อไปนี้ Hb, Hct, RBC, MCV, MCH, MCHC, RDW และตรวจหาชนิดชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติและค่าของปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวัดชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง (HPLC, VARIANT®, Bio-Rad, USA)

4.2 <u>การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด</u>

นำตัวอย่างเลือดที่ทราบว่ามีฮีโมโกลบินผิดปกติจากวิธีวัดชนิดฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูงแล้วจากข้อ 4.1 มาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Minikit (Blood/Cultured cell) (Geneaid Biotech Ltd; Taiwan)

4.3 <u>การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีการตรวจหาลำดับเบสโดยวิธีอัตโนมัติ</u>

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบค่า retention time ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิด มาทำการตรวจหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Avant 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems; Thailand) ตามวิธีของ Tamary H และคณะ [29] กับ Nopparatana C และคณะ [30]

4.4 <u>การพัฒนาวิธีการตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น</u> (reverse dot blot hybridization, RDB)

เทคนิครีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น จะช่วยให้สามารถตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของยีนธาลัสซีเมียได้ครั้งละหลายชนิด หลักการของเทคนิคนี้ คือการสร้าง ASO probes หลายๆชนิดที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่ อะมิโน (NH2) นำมายึดติดบนแผ่นไนลอนเมมแบรน (nylon membrane) ที่เป็นประจุลบ แล้วนำ ดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่ได้ทำ PCR โดยใช้นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอติดฉลากอยู่กับ biotin มา hybridize ด้วย ASO probe กับดีเอ็นเอของผู้ป่วย โดยการทำ color detection วิธีการดังกล่าวจะทำให้สามารถทราบชนิดของการผ่าเหล่าของยีนได้ โดยการทำ hybridization เพียงครั้งเดียว เพราะเป็นการนำดีเอ็นเอของผู้ป่วยมา hybridize

กับ ASO probes หลายๆชนิด ที่ยึดติดอยู่บนแผ่น membrane แผ่นเดียวกันวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว เหมาะสำหรับตรวจหาชนิดการผ่าเหล่าของยีนเบต้าหรือแอลฟ้า ขั้นตอนในการศึกษาประกอบด้วย

4.4.1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการด้วยวิธีพีซีอาร์ polymerase chain reaction

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.2 มาเพิ่มปริมาณยีนเบต้าหรือแอลฟ้าโกลบินโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเบต้าหรือแอลฟ้าโกลบินขึ้นอยู่กับชนิดความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่ได้จากการวัดชนิดฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง (HPLC, VARIANT®) โดยแต่ละชุดไพรเมอร์จะติดฉลากด้วย biotin ที่ด้าน 5' ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการด้วยวิธีพีซีอาร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์
RDB 1	Biotin 5' AAC TCC TAA GCC AGT GCC AGA AGA 3'
RDB 2	Biotin 5' TCA TTC GTC TGT TTC CCA TTC TAA AC 3'
RDB 3	Biotin 5' TAT CAT GCC TCT TTG CAC CAT TCT 3'
RDB 4	Biotin 5' CAC TGA CCT CCC ACA TCT CCT TTT 3'
RDB 5	Biotin 5' CATGCCTGGCACGCTTTGCTGA 3'
RDB 6	Biotin 5' GATGTTCCTGTCCTTCCCCACCA 3'

4.4.2 วิธีทดสอบหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์สดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

การทำ hybridization โดยทั่วไป จะทำโดยการตรึง (fix) ดีเอ็นเอ ซึ่งมีประจุลบบนแผ่น nylon membrane ประจุบวก แต่การทำ Reverse Dot Blot ต้องการตรึง oligonucleotide probe ที่สร้างขึ้น โดยให้ด้านปลาย 5' มีนิวคลีโอไทด์จับอยู่กับหมู่อะมิโน ดังนั้น membrane ที่ใช้เพื่อตรึง probe จึงต้องมีประจุลบและก่อนจะใช้ต้องกระตุ้น (active) carboxyl group บน membrane ก่อนด้วยสาร EDC [1-Ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl, Sigma E 7750] หลังจากนั้นจึงหยดสารละลาย ASO-probe แต่ละชนิดลงบน membrane ที่มีประจุลบนั้น

<u>การเตรียม allele specific probe strip</u>

สร้างสาย allele specific probe ที่ติดฉลากหมู่อะมิโน (NH2) ที่ปลาย 5' ซึ่งลำดับเบสของ allele specific probe สำหรับตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 3 หลังจากนั้นนำ allele specific probes มาติดบนไนลอนเมมเบรนที่มีประจุลบ (Biodyne C nylon membrane) ตามวิธีการของ Winichagoon P และคณะ [5] กับ Cai SP และคณะ [31]

<u>การไฮบริไดเซชั่น (hybridization) และ detection</u>

นำพีซีอาร์จากข้อ 4.4.1 มาทำปฏิกิริยากับ allele specific probe strip โดยการนำพีซีอาร์ผสมกับ 40 µl denature solution แล้วต้ม 5 นาที จากนั้นเติมลงในถุงที่มี allele specific probe strip

ซึ่งแช่อยู่ใน hybridization buffer (2xSSC/0.1%SDS) incubate ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย washing buffer (2xSSC/1%SDS) ที่อุณหภูมิ 49°C นาน 10 นาที

การตรวจสอบผลชนิดความผิดปกติของฮีโมโกลบิน (Enzymatic detection) เนื่องจากพีซีอาร์มี biotin ติดอยู่จึงสามารถตรวจสอบผล hybridization ได้โดยใช้ enzymatic reaction

นำ hybridization strip incubate กับ 1:1000 streptavidin alkaline phosphatase ในสารละลาย blocking solution เขย่านาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 0.3% Tween20 ใน buffer 3 นาน 5 นาที แล้วล้างด้วย detection buffer (100mM tris pH9.5, 5mM MgCl2, 100mM NaCl) นาน 5 นาที เติม substrate NBT/BCIP ที่ละลายใน 5 ml detection buffer ทิ้งไว้ในที่มืดนานที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ผลบวกจะเกิดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้ม

ตารางที่ 3 Amino-linked oligonucleotide probes สำหรับตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติโดยเทคนิครีเวอร์สดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น

ชื่อโพรบ	ลำดับเบสของโพรบ
HbO-Indonesia N	NH2- 5' ACCTCCCCGCCGAGTTCAC 3'
HbO-Indonesia M	NH2- 5' TCCCCGCCAAGTTCACC 3'
HbQ-Thailand N	NH2- 5' CGCACGTGGACGACATGCC3'
HbQ-Thailand M	NH2- 5' GCACGTGCACGACATG 3'
HbC N	NH2- 5' CTGACTCCTGAGGAGAAGTC 3'
HbC M	NH2- 5' CTGACTCCTAAGGAGAAG 3'
HbS N (same as HbC N)	NH2- 5' CTGACTCCTGAGGAGAAGTC 3'
HbS M	NH2- 5' ACTCCTGTGGAGAAGTCT 3'
HbG–Makassar N (same as HbC N)	NH2- 5' CTGACTCCTGAGGAGAAGTC 3'
HbG–Makassar M	NH2- 5' GACTCCTGCGGAGAAGTC 3'
HbD-Panjab N	NH2- 5' TGGCAAAGAATTCACCCC 3'
HbD-Panjab M	NH2- 5' GGGTGAATTGTTTGCCAA 3'
HbHope N	NH2- 5' TGGCTGGTGTGGCTAATG 3'
HbHope M	NH2- 5' GCTGATGTGGCTAATGCC 3'
HbTak N	NH2- 5' AAGTATCACTAAGCTCGC 3'
HbTak M	NH2- 5' GTATCACACTAAGCTCGC 3'

4.4 การคำนวณค่าทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าทางโลหิตวิทยาของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดด้วยสถิติ non-parametric kruskal wallis test

ผลการวิจัย

1. การตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา

จากการดำเนินงานของโครงการตั้งแต่วันที่ 2 กรกฎาคม 2550 ถึงวันที่ 1 กรกฎาคม 2552 สามารถเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติจำนวน 45 ราย จากตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจหา Hemoglobin typing ณ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 9,126 ราย และสามารถเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เคยทราบว่ามีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติที่ไม่ใช่ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดฮีโมโกลบินอี ฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง และฮีโมโกลบินเอช จากการตรวจหา Hemoglobin typing ด้วยวิธี HPLC ในช่วงปี พ.ศ. 2543 ถึง วันที่ 31 พฤษภาคม 2550 จำนวน 13 ราย รายละเอียดของค่าทางโลหิตวิทยาของตัวอย่างทั้งหมดแสดงตามตารางที่ 4 และแผนภาพโครมาโตแกรมของผล Hemoglobin typing แสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 4 รายละเอียดของตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติ

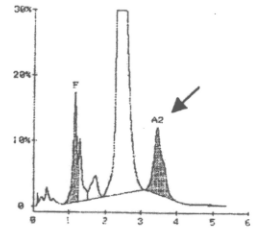
ก. ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เคยทราบว่ามีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติแล้วในช่วงปี พ.ศ. 2543 ถึง วันที่ 31 พฤษภาคม 2550

DNA CODE	ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (blood indicies)							Hb_Typing	%A2	%F	% ab Hb	HPLC window	RT peak
	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	RDW						
30298	4.46	10.2	31.0	70.0	22.9	32.7	18.1	AF+ Ab Hb	-	7.7	12.2	A2	3.45
20600	5.11	12.0	38.0	74.0	23.6	31.9	16.2	AF+ Ab Hb	-	4.0	14.4	A2	3.48
28957	5.01	13.0	38.0	76.0	25.9	33.9	13.6	AA2+ Ab Hb	1.8	0.0	35.5	D	4.04
31460	4.67	12.7	37.0	78.0	27.2	34.8	14.5	AA2+ Ab Hb	3.6	39.3	0.0	D	4.12
24377	4.21	11.4	33.0	78.0	27.1	34.8	13.4	AA2+ Ab Hb	3.9	0.0	38.4	S	4.54
29032	3.73	11.2	31.0	84.0	30.0	35.7	13.7	AA2+ Ab Hb	3.2	0.0	40.5	C	5.12
26240	5.92	15.7	45.0	75.0	26.5	35.2	14.0	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	36.9	C	5.14
25072	4.55	10.6	30.0	68.0	24.2	35.6	19.9	AA2+ Ab Hb	3.0	0.0	36.3	C	5.15
24092	5.12	14.1	41.0	79.0	27.6	34.7	13.9	AA2+ Ab Hb	3.3	0.0	32.5	C	5.15
25512	5.13	13.9	39.0	75.0	27.1	36.6	13.7	AA2+ Ab Hb	3.4	0.0	38.3	C	5.16
31112	5.30	14.7	42.0	80.0	27.7	34.8	13.3	AA2+ Ab Hb	3.1	0.0	38.7	C	5.16
30940	5.72	15.9	46.0	81.0	27.8	34.3	13.3	AA2+ Ab Hb	3.3	0.0	40.7	C	5.16
31043	4.36	11.8	33.0	76.0	27.1	35.4	14.7	AA2+ Ab Hb	3.1	0.0	37.2	C	5.17

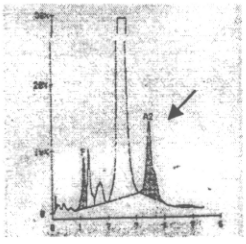
ข. ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติในช่วงวันที่ 1 มิถุนายน 2550 ถึงวันที่ 1 กรกฎาคม 2552

DNA CODE	ค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (blood indicies)							Hb_Typing	%A2 or %E	%F	% ab Hb	HPLC window	RT peak
	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	RDW						
35814	4.25	8.7	28.0	64.7	20.5	31.6	17.6	F+ Ab Hb	-	2.2	6.9	A2	3.68
34832	5.04	13.9	40.8	81.1	27.6	34.1	12.3	E+ Ab Hb	31.5	0.0	62.2	D	4.01
36087	4.21	11.4	38.0	90.3	27.1	30.0	15.8	AA2+ Ab Hb	3.1	0.0	40.2	D	4.04
36089	4.22	11.7	39.1	85.7	25.7	33.6	15.8	AA2+ Ab Hb	3.2	0.0	39.4	D	4.04
36105	5.95	16.2	48.0	81.1	27.2	33.5	14.2	AA2+ Ab Hb	3.2	0.0	40.9	D	4.04
37032	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	E+ Ab Hb	24.6	0.0	62.8	D	4.06
37369	5.46	14.9	43.0	78.8	27.3	34.7	14.1	AA2+ Ab Hb	5.7	0.0	34.0	D	4.06
38183	7.84	18.0	51.1	65.2	23.0	35.2	25.4	FA2+ Ab Hb	7.4	7.9	78.9	D	4.06
36626	6.21	15.8	53.7	87.0	25.4	29.4	15.9	AA2+ Ab Hb	3.5	0.0	35.2	D	4.07
36789	4.61	11.6	34.3	74.0	25.2	33.8	14.7	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	34.2	D	4.08
35685	5.54	15.4	40.0	72.2	27.8	38.5	14.7	E+ Ab Hb	42	0.0	51.4	D	4.11
38368	6.0	16.4	47.3	76.4	26.5	34.7	12.8	AA2+ Ab Hb	1.9	0.0	34.4	D	4.11
32017	5.43	15.7	46.6	85.5	28.9	33.7	12.9	AA2+ Ab Hb	3.0	0.0	40.8	D	4.12
32019	4.98	13.0	39.1	78.0	26.1	33.3	14.3	AA2+ Ab Hb	7.1	0.0	30.7	D	4.16
32679	4.02	9.6	29.4	73.1	23.9	32.6	17	AA2+ Ab Hb	1.9	0.0	36.7	D	4.16
36786	5.3	15.9	44.7	84.2	29.9	35.6	13.2	AA2+ Ab Hb	5.3	0.0	35.3	D	4.16
34326	5.39	16.4	45.8	85.0	30.4	35.8	12.6	AA2+ Ab Hb	4.80	0.0	30.7	S	4.26
33553	5.71	17.3	51.3	89.3	30.0	33.6	12.2	AA2+ Ab Hb	4.3	0.0	34.3	S	4.28
37624	4.86	15.7	44.2	90.9	32.3	35.5	13.3	AA2+ Ab Hb	3.1	0.0	41.7	S	4.48
32591	4.32	10.3	31.0	71.8	23.8	33.2	17.5	AA2+ Ab Hb	3.9	0.0	38.1	S	4.54
40205	5.0	11.7	35.2	71.0	23.6	33.2	14.0	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	39.0	S	4.55
33357	4.61	12.3	37.5	81.3	26.7	32.8	17.9	AA2+ Ab Hb	2.8	0.0	15.6	S	4.64
32658	4.04	10.8	31.7	78.5	26.7	34.1	14.2	AA2+ Ab Hb	2.9	0.0	29.2	S	4.65
35815	5.43	12.3	39.0	72.4	22.8	31.4	14.3	AE+ Ab Hb	25	0.0	7.6	S	4.84
32185	3.61	10.3	30.6	84.7	28.4	33.5	13.7	AA2+ Ab Hb	1.9	0.0	20.1	C	4.95
37190	4.59	11.7	31.9	69.5	25.5	36.7	15.6	E+ Ab Hb	30.8	0.0	57.6	C	5.10
34854	4.15	11.5	31.4	75.7	27.7	36.6	14.3	AA2+ Ab Hb	3.50	0.0	38.8	C	5.12
35007	4.87	12.2	36.2	74.3	25.1	33.7	18.9	AA2+ Ab Hb	3.60	0.0	37.3	C	5.12
36836	4.14	12.0	34.1	82.0	29.0	35.2	14.5	AA2+ Ab Hb	3.0	0.2	40.4	C	5.12
37714	5.59	13.0	36.7	65.7	23.3	35.4	15.7	AA2+ Ab Hb	3.4	0.0	37.3	C	5.12
37622	5.54	15.2	43.0	77.6	27.4	35.3	13.8	AA2+ Ab Hb	1.1	0.0	32.9	C	5.13
32088	4.50	11.2	34.2	75.5	24.8	32.7	19.7	AFA2+ Ab Hb	4.8	15.2	61.1	C	5.15
32044	4.24	11.6	32.3	76.2	27.4	35.9	14.4	AA2+ Ab Hb	3.8	0.0	38	C	5.16
32471	4.60	11.1	32.0	69.6	24.1	34.7	17.5	AA2+ Ab Hb	3.4	0.0	33.6	C	5.16
33426	3.84	7.1	22.6	58.9	18.5	31.4	19.8	AA2+ Ab Hb	3.3	0.0	30.9	C	5.16
34588	ND	ND	30.2	79.3	ND	ND	ND	AA2+ Ab Hb	3.90	0.0	38.1	C	5.16
34793	4.78	11.7	33.5	70.1	24.5	34.9	16.1	AA2+ Ab Hb	3.70	0.0	37.2	C	5.16
33136	5.78	14.9	42.0	72.7	25.8	35.5	13.8	AA2+ Ab Hb	3.5	0.0	35.1	C	5.17
33718	5.23	13.7	40.8	78.0	26.2	33.6	16	AA2+ Ab Hb	3.8	0.0	41.5	C	5.17
38651	5.6	14.7	42.9	77.0	26.4	34.3	14.3	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	39.0	C	5.18
38943	ND	12.2	34.0	77.0	26.5	ND	ND	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	39.9	C	5.18
39402	4.7	11.7	33.3	70.4	24.7	35.1	15.4	AA2+ Ab Hb	3.4	0.0	34.2	C	5.18
40064	5.6	10.5	29.4	52.7	18.8	35.7	21.1	FA2+ Ab Hb	5.6	2.8	91.0	C	5.20
40173	3.8	10.1	29.2	77.7	26.9	34.6	19.0	AA2+ Ab Hb	3.3	0.0	41	C	5.20
40444	3.9	11.2	31.7	81.7	28.9	35.3	14.1	AA2+ Ab Hb	3.7	0.0	39.0	C	5.20

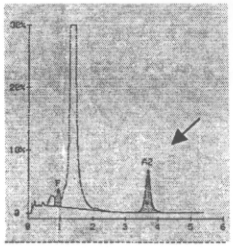
สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร



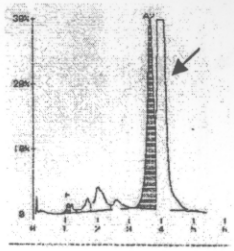
Case no. 30298, RT peak 3.45



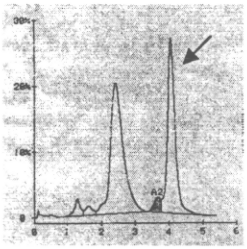
Case no. 20600, RT peak 3.48



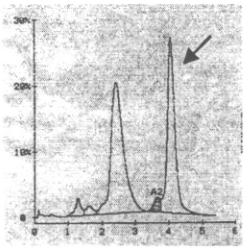
Case no. 35814, RT peak 3.68



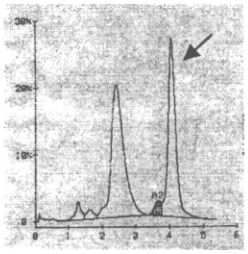
Case no. 34832, RT peak 4.01



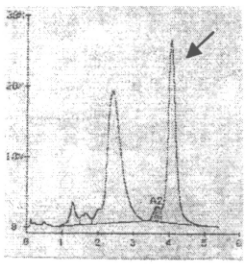
Case no. 28957, RT peak 4.04



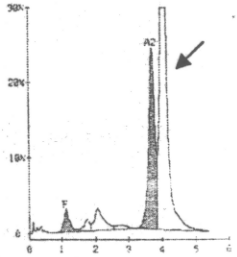
Case no. 36087, RT peak 4.04



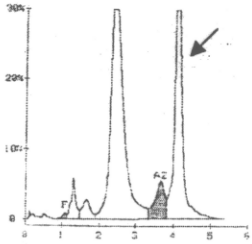
Case no. 36105, RT peak 4.04



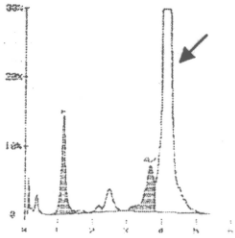
Case no. 36089, RT peak 4.04



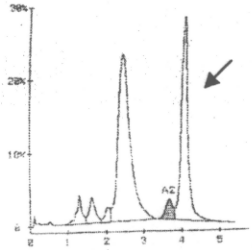
Case no. 37032, RT peak 4.06



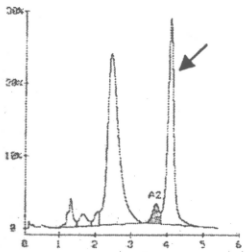
Case no. 37369, RT peak 4.06



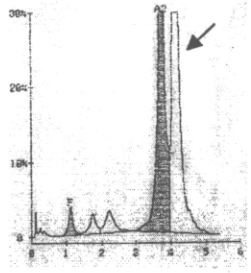
Case no. 38183, RT peak 4.06



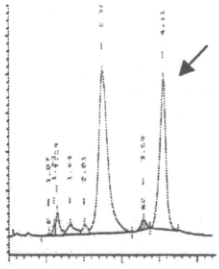
Case no.36626, RT peak 4.07



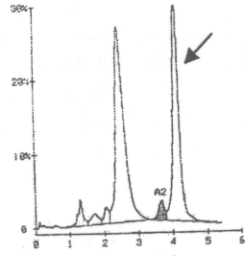
Case no. 36789, RT peak 4.08



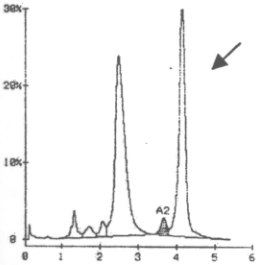
Case no. 35685, RT peak 4.11



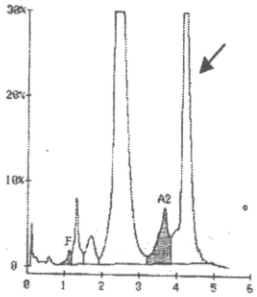
Case no. 38368, RT peak 4.11



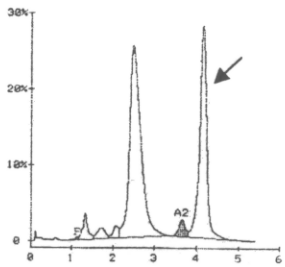
Case no. 31460, RT peak 4.12



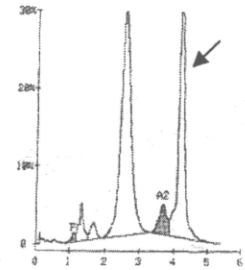
Case no. 32017, RT peak 4.12



Case no. 32019, RT peak 4.16

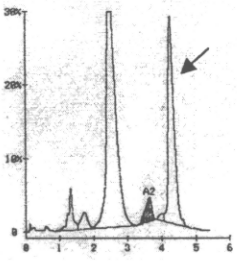


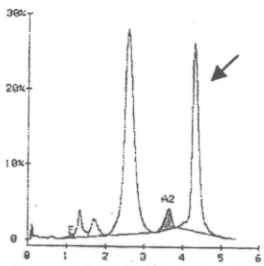
Case no. 32679, RT peak 4.16

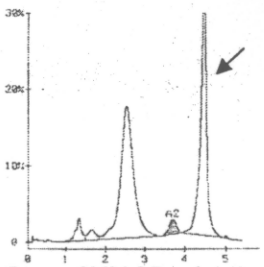


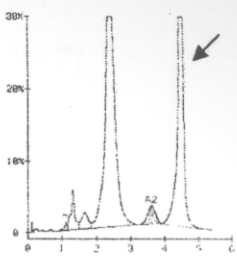
Case no. 36786, RT peak 4.16

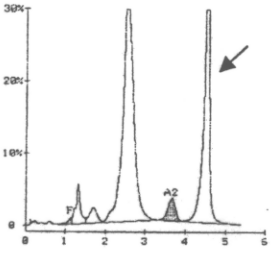
ภาพที่ 1 ภาพแสดงโครมาโตแกรมของผล Hemoglobin typing แยกตามค่า retention time (RT time) ของ peak

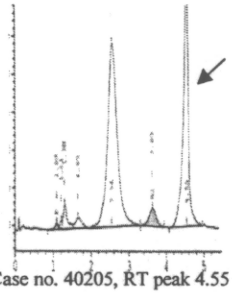

Case no. 34326,RT peak 4.26

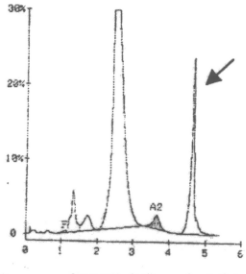

Case no. 33553, RT peak 4.28

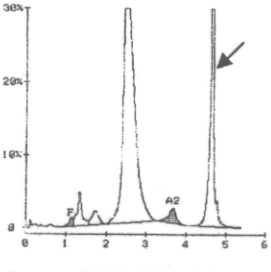

Case no. 37624, RT peak 4.48

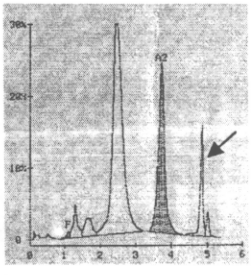

Case no. 24377, RT peak 4.54

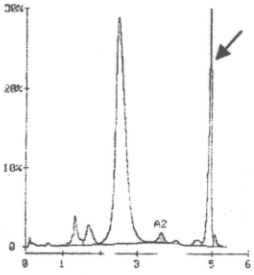

Case no. 32591, RT peak 4.54

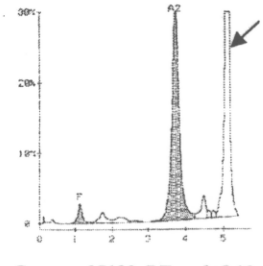

Case no. 40205, RT peak 4.55

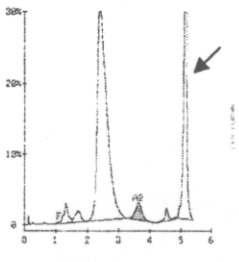

Case no. 33357, RT peak 4.64

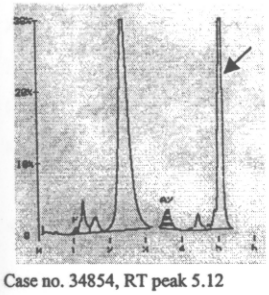

Case no. 32658, RT peak 4.65

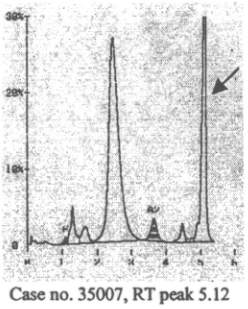

Case no. 35815,,RT peak 4.65

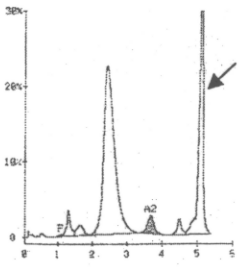

Case no. 32185, RT peak 4.95

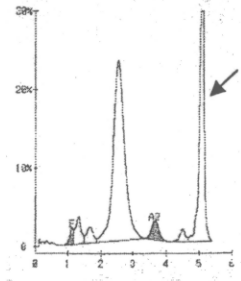

Case no. 37190, RT peak 5.10

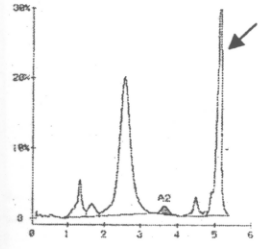

Case no. 29032, RT peak 5.12

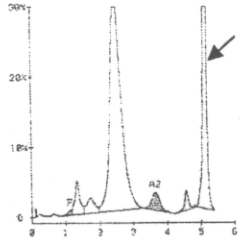

Case no. 34854, RT peak 5.12

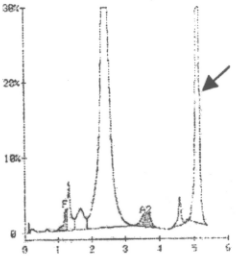

Case no. 35007, RT peak 5.12

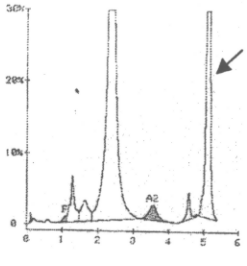

Case no. 36836, RT peak 5.12


Case no. 37714, RT peak 5.12

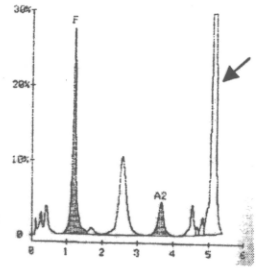

Case no. 37622, RT peak 5.13


Case no. 26240, RT peak 5.14

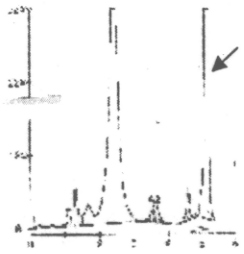

Case no. 24092, RT peak 5.15


Case no. 25072, RT peak 5.15

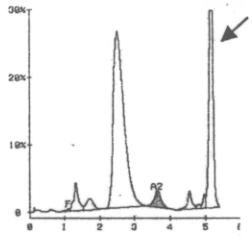
ภาพที่ 1 (ต่อ)



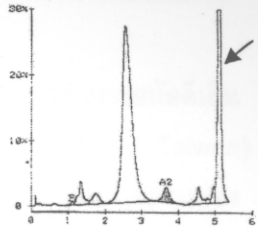
Case no. 32088, RT peak 5.15



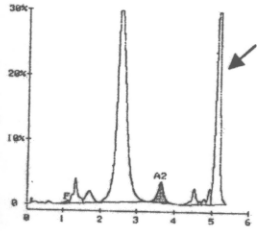
Case no. 25512, RT peak 5.16



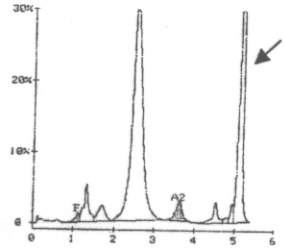
Case no. 30940, RT peak 5.16



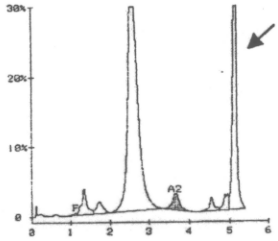
Case no. 31112, RT peak 5.16



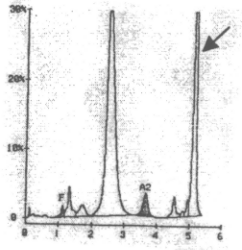
Case no. 32044 RT peak 5.16



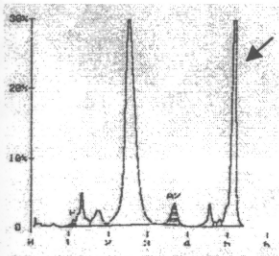
Case no. 32471, RT peak 5.16



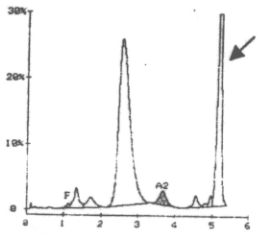
Case no. 33426, RT peak 5.16



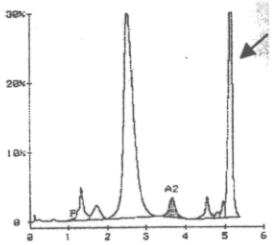
Case no. 34588, RT peak 5.16



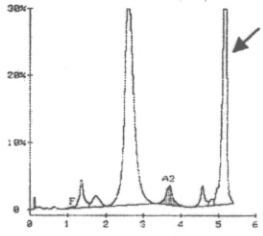
Case no. 34793, RT peak 5.16



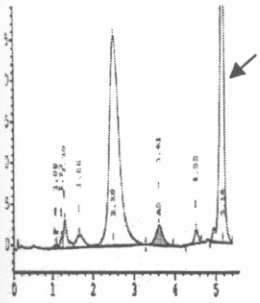
Case no. 31043, RT peak 5.17



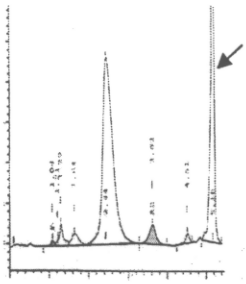
Case no. 33136, RT peak 5.17



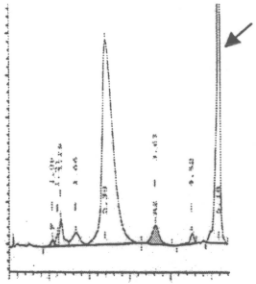
Case no. 33718, RT peak 5.17



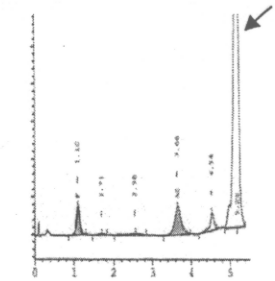
Case no. 38651, RT peak 5.18



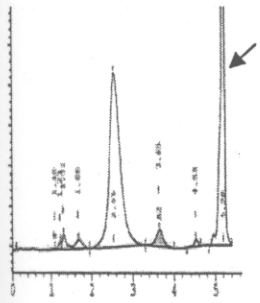
Case no. 38943, RT peak 5.18



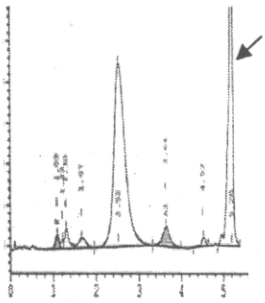
Case no. 39402, RT peak 5.18



Case no. 40064, RT peak 5.20



Case no. 40173, RT peak 5.20



Case no. 40444, RT peak 5.20

ภาพที่ 1 (ต่อ)

2. ตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีการตรวจหาลำดับเบสด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (Automate DNA sequencing)

ตัวอย่างเลือดที่มีภาวะฮีโมโกลบินผิดปกติจากข้อ 1 ทั้งหมดจำนวน 58 ราย นำมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Minikit (Blood/Cultured cell) (Geneaid Biotech Ltd; Taiwan) เพิ่มปริมาณยีนเบต้าหรือแอลฟ่าโกลบินโดยการทำพีซีอาร์ และตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีการตรวจหาลำดับเบสด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (Automate DNA sequencing) ผลจากการศึกษาพบความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินจำนวน 8 ชนิด คือ ฮีโมโกลบินชนิดซี (Hb C) 28 ราย คิดเป็น 48.3 เปอร์เซ็นต์, ฮีโมโกลบินชนิด D Panjab 12 ราย คิดเป็น 20.7 เปอร์เซ็นต์, ฮีโมโกลบินชนิดตาก (Hb Tak) 7 ราย คิดเป็น 12.1 เปอร์เซ็นต์, ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar 4 ราย คิดเป็น 6.9 เปอร์เซ็นต์, ฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Hollandia 2 ราย คิดเป็น 3.4 เปอร์เซ็นต์, ฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand หรือฮีโมโกลบินมหิดล 2 ราย คิดเป็น 3.4 เปอร์เซ็นต์, ฮีโมโกลบินชนิด O-Indonesia 2 ราย คิดเป็น 3.4 เปอร์เซ็นต์ และฮีโมโกลบินชนิด Hope 1 ราย คิดเป็น 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลดังกล่าวได้แสดงในตารางที่ 5 และ 6 ผลโครมาโตแกรมของลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab, ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar, ฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Hollandia, ฮีโมโกลบินชนิดตาก, ฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand, ฮีโมโกลบินชนิด O-Indonesia และฮีโมโกลบินชนิด Hope ได้แสดงในภาพที่ 2-8 ตามลำดับ และผลชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติเมื่อเทียบกับผลของโครมาโตแกรมของHb typing แสดงดังภาพที่ 9

ตารางที่ 5 ฮีโมโกลบินผิดปกติที่ตรวจพบ

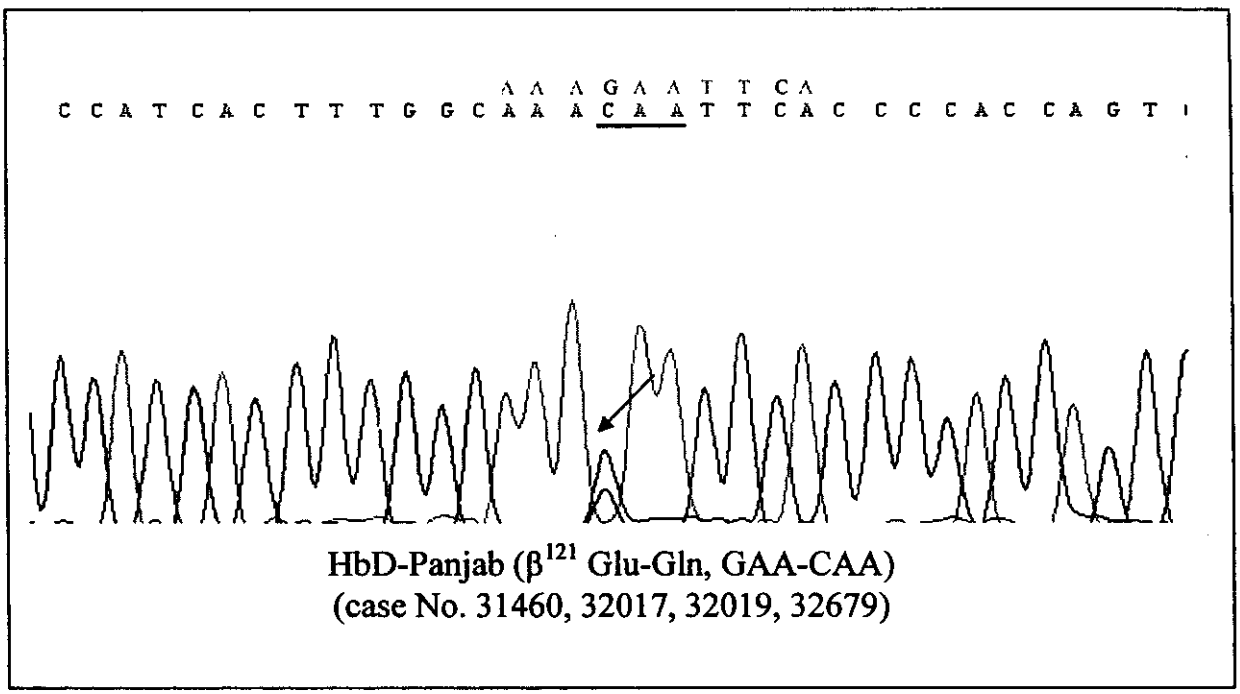
DNA CODE	Hb_Typing	%A2 or %E	%F	% ab Hb	HPLC window	RT peak	Abnormal Hb
30298	AF+ Ab Hb	-	7.7	12.2	A2	3.45	Hb Lepore
20600	AF+ Ab Hb	-	4.0	14.4	A2	3.48	Hb Lepore
35814	F+ Ab Hb	-	2.2	6.9	A2	3.68	Hb Hope
34832	E+Ab Hb	31.5	0.0	62.2	D	4.01	HbD Panjab with HbE
28957	AA2+ Ab Hb	1.8	0.0	35.5	D	4.04	HbD Panjab
36087	AA2+ Ab Hb	3.1	0.0	40.2	D	4.04	HbD Panjab
36105	AA2+ Ab Hb	3.2	0.0	40.9	D	4.04	HbD Panjab
36089	AA2+ Ab Hb	3.2	0.0	39.4	D	4.04	HbD Panjab
37032	E+ Ab Hb	24.6	0.0	62.8	D	4.06	HbD Panjab with HbE
37369	AA2+ Ab Hb	5.7	0.0	34.0	D	4.06	Hb Tak
38183	FA2+ Ab Hb	7.4	7.9	78.9	D	4.06	Hb Tak
36626	AA2+ Ab Hb	3.5	0.0	35.2	D	4.07	HbD Panjab
36789	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	34.2	D	4.08	HbD Panjab
35685	E+ Ab Hb	42	0.0	51.4	D	4.11	Hb Tak
38368	AA2+ Ab Hb	1.9	0.0	34.4	D	4.11	HbD Panjab
31460	AA2+ Ab Hb	3.6	39.3	0.0	D	4.12	HbD Panjab
32017	AA2+ Ab Hb	3.0	0.0	40.8	D	4.12	HbD Panjab
32019	AA2+ Ab Hb	7.1	0.0	30.7	D	4.16	Hb Tak
32679	AA2+ Ab Hb	1.9	0.0	36.7	D	4.16	HbD Panjab
36786	AA2+ Ab Hb	5.3	0.0	35.3	D	4.16	Hb Tak
34326	AA2+ Ab Hb	4.80	0.0	30.7	S	4.26	Hb Tak
33553	AA2+ Ab Hb	4.3	0.0	34.3	S	4.28	Hb Tak
37624	AA2+ Ab Hb	3.1	0.0	41.7	S	4.48	HbG-Makassar
24377	AA2+ Ab Hb	3.9	0.0	38.4	S	4.54	HbG-Makassar
32591	AA2+ Ab Hb	3.9	0.0	38.1	S	4.54	HbG-Makassar
40205	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	39.0	S	4.55	HbG-Makassar
33357	AA2+ Ab Hb	2.8	0.0	15.6	S	4.64	HbQ-Thailand
32658	AA2+ Ab Hb	2.9	0.0	29.2	S	4.65	HbQ-Thailand
35815	AE+ Ab Hb	25	0.0	7.6	S	4.84	HbO-Indonesia with HbE
32185	AA2+ Ab Hb	1.9	0.0	20.1	C	4.95	HbO-Indonesia
37190	E+ Ab Hb	30.8	0.0	57.6	C	5.10	HbC with HbE
29032	AA2+ Ab Hb	3.2	0.0	40.5	C	5.12	HbC with beta 3.5 kb del.
34854	AA2+ Ab Hb	3.50	0.0	38.8	C	5.12	HbC
35007	AA2+ Ab Hb	3.60	0.0	37.3	C	5.12	HbC
36836	AA2+ Ab Hb	3.0	0.2	40.4	C	5.12	HbC
37714	AA2+ Ab Hb	3.4	0.0	37.3	C	5.12	HbC
37622	AA2+ Ab Hb	1.1	0.0	32.9	C	5.13	HbC
26240	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	36.9	C	5.14	HbC
24092	AA2+ Ab Hb	3.3	0.0	32.5	C	5.15	HbC
25072	AA2+ Ab Hb	3.0	0.0	36.3	C	5.15	HbC

ตารางที่ 5 (ต่อ)

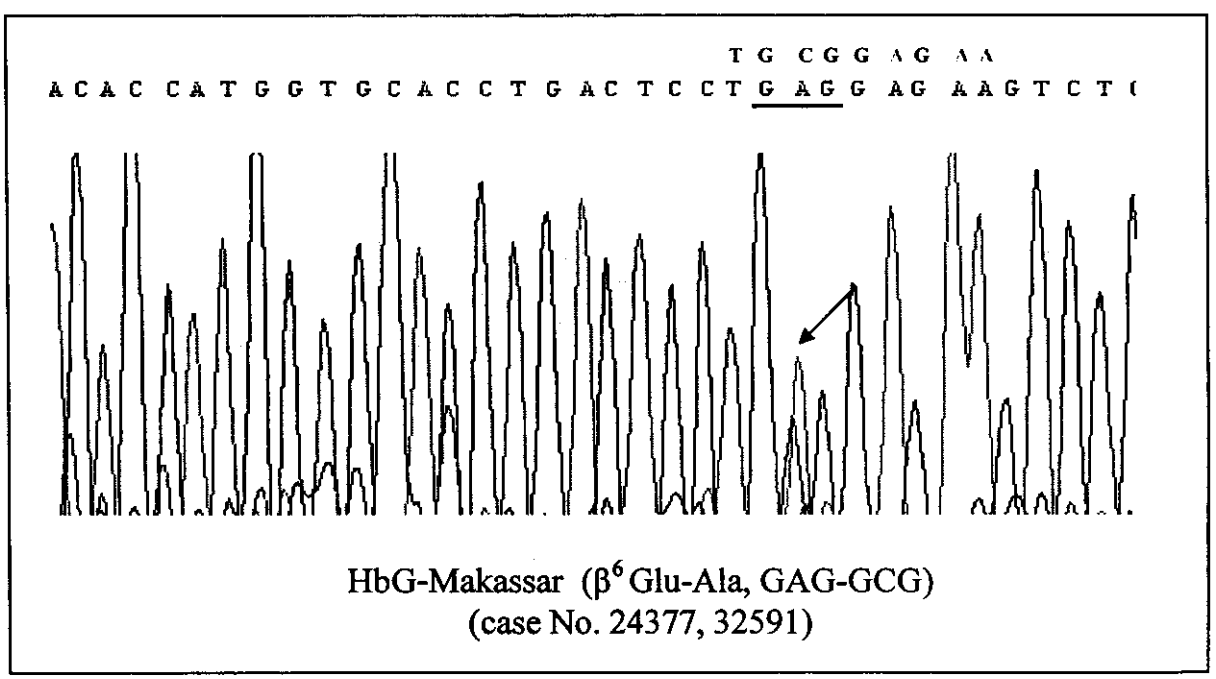
DNA CODE	Hb_Typing	%A2 or %E	%F	% ab Hb	HPLC window	RT peak	Abnormal Hb
32088	AFA2+Ab Hb	4.8	15.2	61.1	C	5.15	HbC
25512	AA2+ Ab Hb	3.4	0.0	38.3	C	5.16	HbC
30940	AA2+ Ab Hb	3.3	0.0	40.7	C	5.16	HbC
31112	AA2+ Ab Hb	3.1	0.0	38.7	C	5.16	HbC
32044	AA2+ Ab Hb	3.8	0.0	38.0	C	5.16	HbC
32471	AA2+ Ab Hb	3.4	0.0	33.6	C	5.16	HbC
33426	AA2+ Ab Hb	3.3	0.0	30.9	C	5.16	HbC
34588	AA2+ Ab Hb	3.90	0.0	38.1	C	5.16	HbC
34793	AA2+ Ab Hb	3.70	0.0	37.2	C	5.16	HbC
31043	AA2+ Ab Hb	3.1	0.0	37.2	C	5.17	HbC
33136	AA2+ Ab Hb	3.5	0.0	35.1	C	5.17	HbC
33718	AA2+ Ab Hb	3.8	0.0	41.5	C	5.17	HbC
38651	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	39.0	C	5.18	HbC
38943	AA2+ Ab Hb	3.6	0.0	39.9	C	5.18	HbC
39402	AA2+ Ab Hb	3.4	0.0	34.2	C	5.18	HbC
40064	FA2+ Ab Hb	5.6	2.8	91.0	C	5.20	HbC
40173	AA2+ Ab Hb	3.3	0.0	41.0	C	5.20	HbC
40444	AA2+ Ab Hb	3.7	0.0	39.0	C	5.20	HbC

ตารางที่ 6 ตารางสรุปจำนวนและชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย

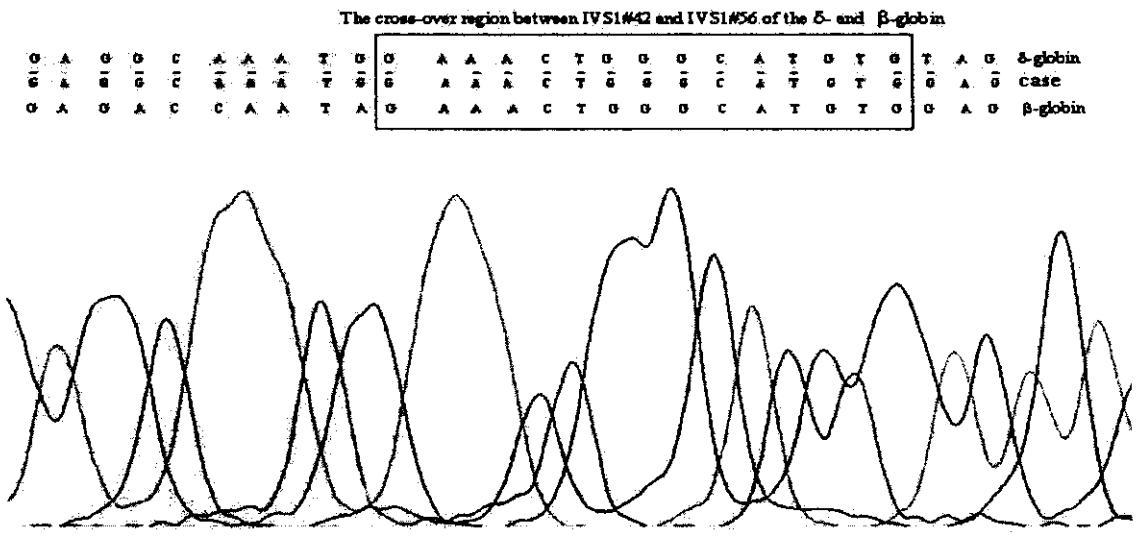
ชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติ	จำนวน (ราย)	ความถี่ (%)
Hb C ($\beta 6^{Glu-Lys}$)	28	48.3
Hb D-Panjab ($\beta 121^{Glu-Gln}$)	12	20.7
Hb Tak (β146 Term - Thr, AC insertion)	7	12.1
Hb G-Makassa ($\beta 6^{Glu-Ala}$)	4	6.9
Hb Lepore-Hollandia	2	3.4
(The cross-over region between $\delta^{IVS1\#42}$ and $\beta^{IVS1\#56}$)		
Hb Q-Thailand ($\alpha 74^{Asp-His}$)	2	3.4
Hb O-Indonesia ($\alpha 116^{Glu-Lys}$)	2	3.4
Hb Hope ($\beta 136^{Gly-Asp}$)	1	1.8



ภาพที่ 2 ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด HbD-Panjab

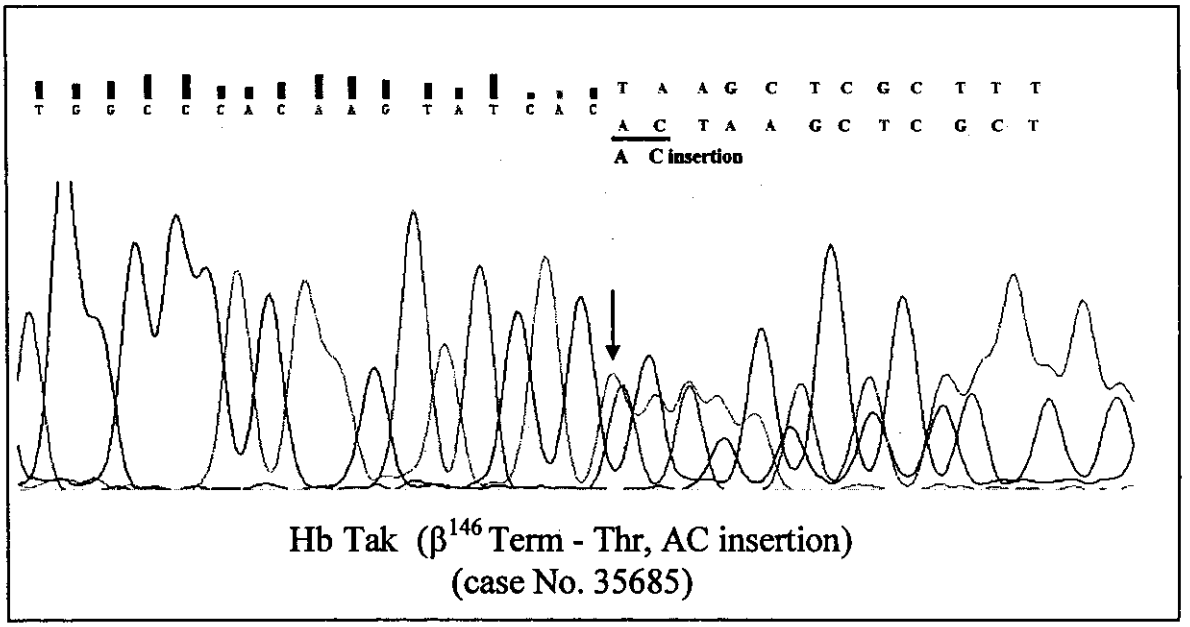


ภาพที่ 3 ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด HbG-Makassar



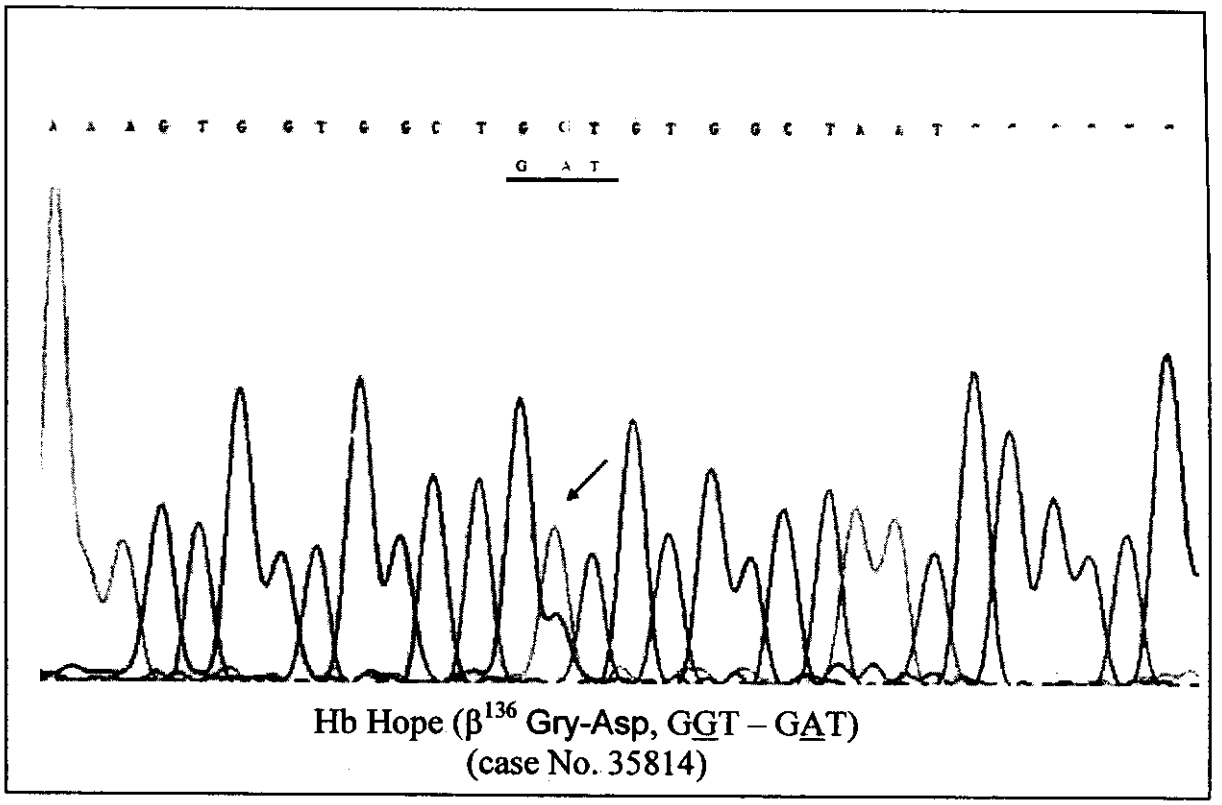
Hb Lepore-Hollandia
(The cross-over region between IVS1#42 and IVS1#56 of the δ- and β-globin)
(case No. 20600, 30298)

ภาพที่ 4 ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด Hb Lepore-Hollandia

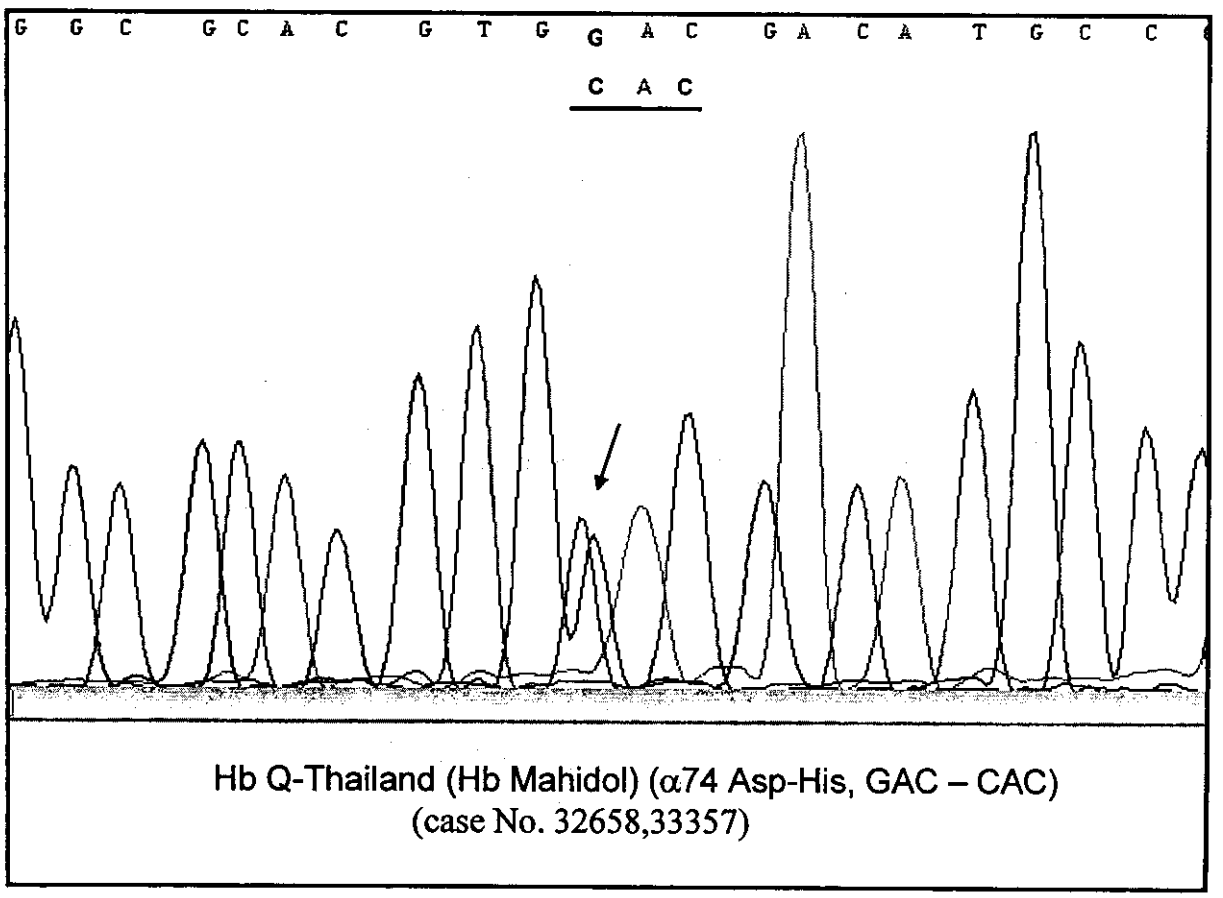


Hb Tak (β^{146} Term - Thr, AC insertion)
(case No. 35685)

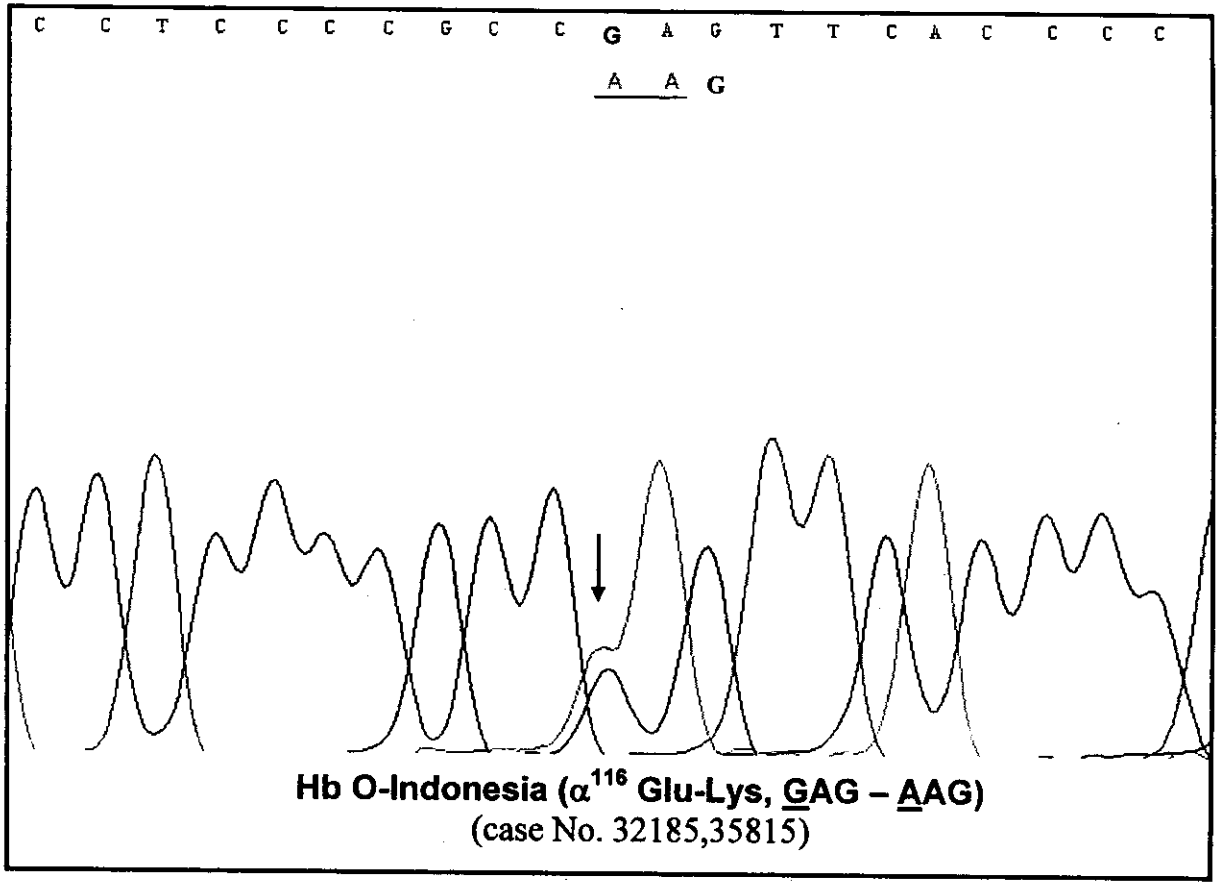
ภาพที่ 5 ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิดดาก



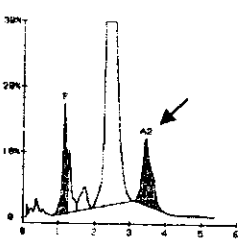
ภาพที่ 6 ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด Hope



ภาพที่ 7 ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand

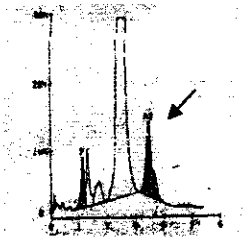


ภาพที่ 8 ภาพโครมาโตแกรมแสดงลำดับเบสของฮีโมโกลบินชนิด Hb O-Indonesia



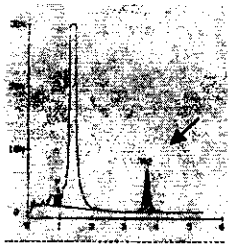
Case no. 30298, RT peak 3.45

Hb Lepore



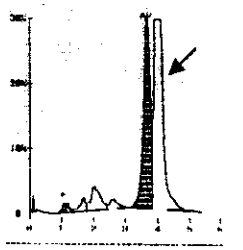
Case no. 20600, RT peak 3.48

Hb Lepore



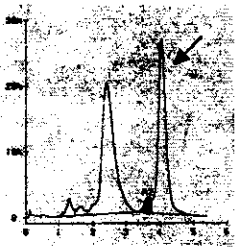
Case no. 35814, RT peak 3.68

Hb Hope



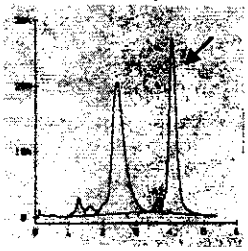
Case no. 34832, RT peak 4.01

Hb D Panjab



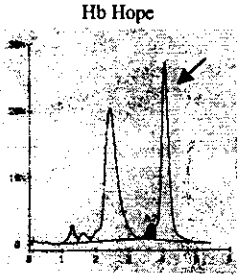
Case no. 28957, RT peak 4.04

Hb D Panjab



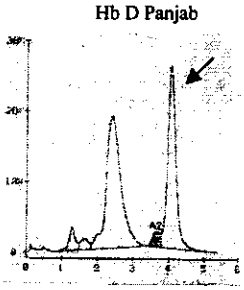
Case no. 36087, RT peak 4.04

Hb D Panjab



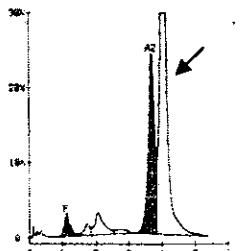
Case no. 36105, RT peak 4.04

Hb D Panjab



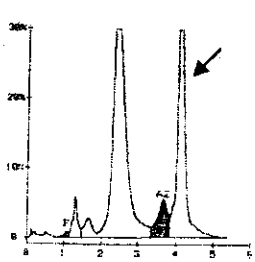
Case no. 36089, RT peak 4.04

Hb D Panjab



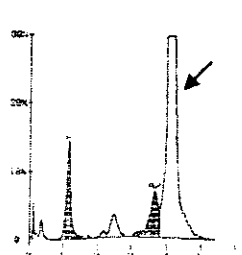
Case no. 37032, RT peak 4.06

Hb D Panjab with HbE



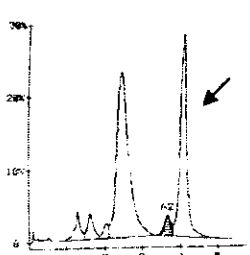
Case no. 37369, RT peak 4.06

Hb Tak



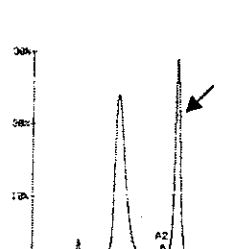
Case no. 38183, RT peak 4.06

Hb Tak



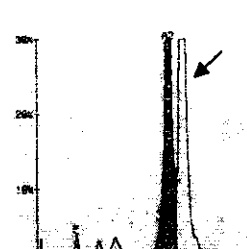
Case no.36626, RT peak 4.07

Hb D Panjab



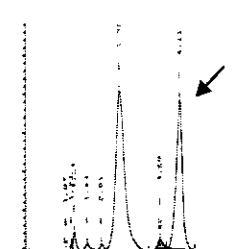
Case no. 36789, RT peak 4.08

Hb D Panjab



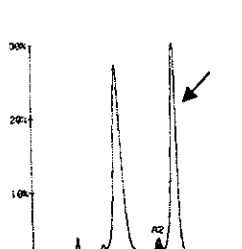
Case no. 35685, RT peak 4.11

Hb Tak with HbE



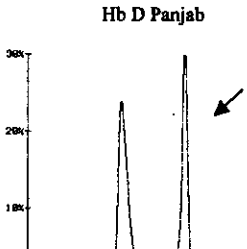
Case no. 38368, RT peak 4.11

Hb D-Panjab



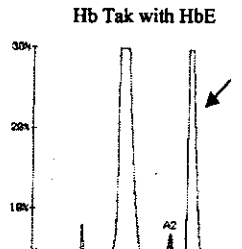
Case no. 31460, RT peak 4.12

Hb D-Panjab



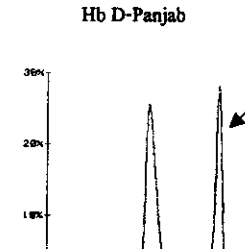
Case no. 32017, RT peak 4.12

Hb D-Panjab



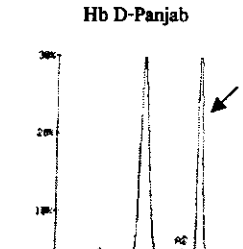
Case no. 32019, RT peak 4.16

Hb Tak



Case no. 32679, RT peak 4.16

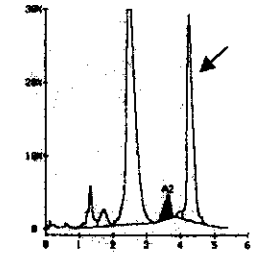
Hb D-Panjab



Case no. 36786, RT peak 4.16

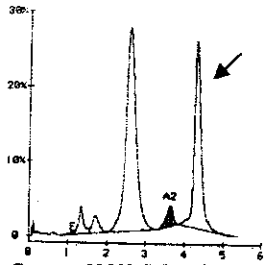
Hb Tak

ภาพที่ 9 ภาพแสดงโครมาโตแกรมของผล Hemoglobin typing เปรียบเทียบกับชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ (ลูกศร แสดงตำแหน่งของฮีโมโกลบินผิดปกติ)



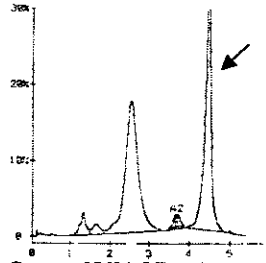
Case no. 34326,RT peak 4.26

Hb Tak



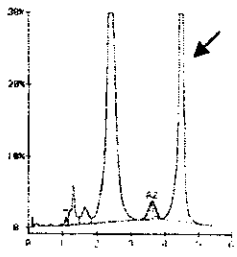
Case no. 33553, RT peak 4.28

Hb Tak



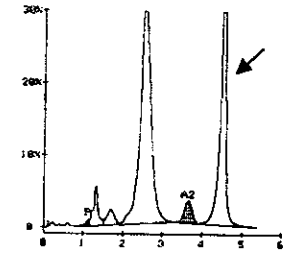
Case no. 37624, RT peak 4.48

HbG-Makassar



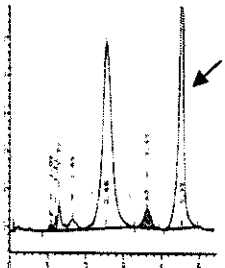
Case no. 24377, RT peak 4.54

HbG-Makassar



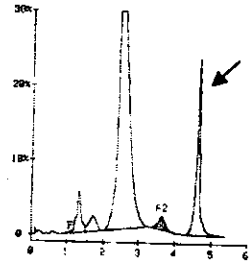
Case no. 32591, RT peak 4.54

HbG-Makassar



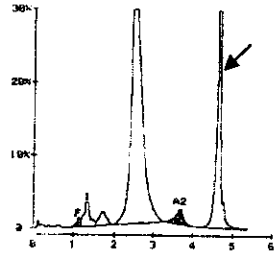
Case no. 40205, RT peak 4.55

HbG-Makassar



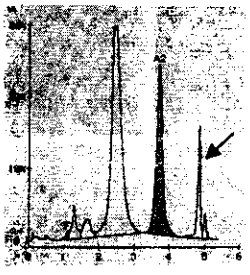
Case no. 33357, RT peak 4.64

Hb Q-Thailand



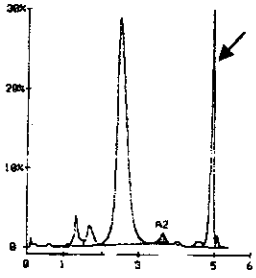
Case no. 32658, RT peak 4.65

Hb Q-Thailand



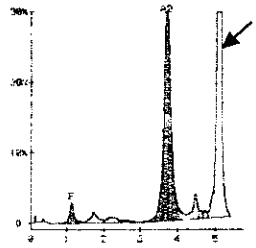
Case no. 35815,,RT peak 4.65

Hb O-Indonesia with HbE



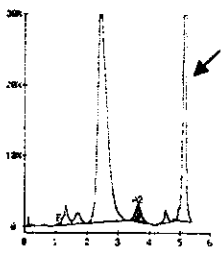
Case no. 32185, RT peak 4.95

Hb O-Indonesia



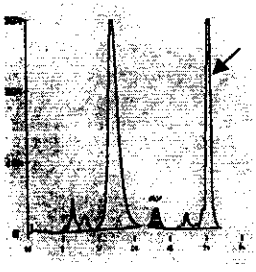
Case no. 37190, RT peak 5.10

HbC with HbE



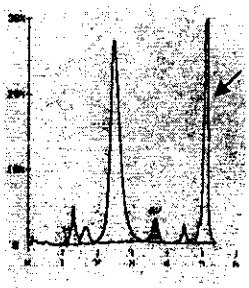
Case no. 29032, RT peak 5.12

HbC



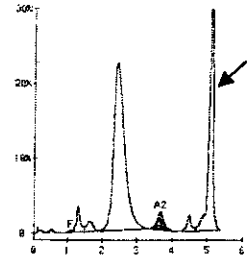
Case no. 34854, RT peak 5.12

HbC



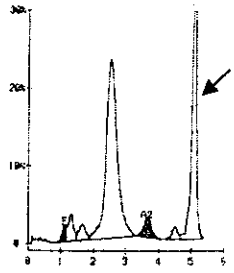
Case no. 35007, RT peak 5.12

HbC



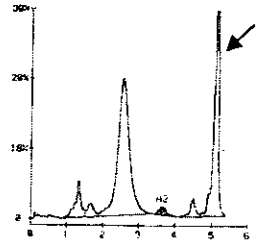
Case no. 36836, RT peak 5.12

HbC



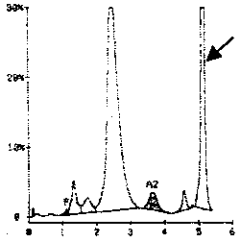
Case no. 37714, RT peak 5.12

HbC



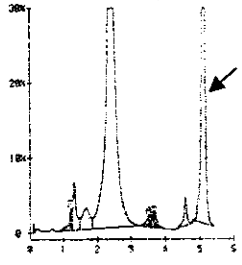
Case no. 37622, RT peak 5.13

HbC



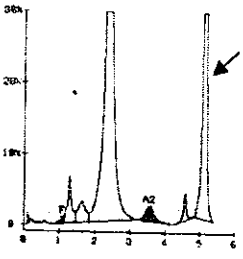
Case no. 26240, RT peak 5.14

HbC



Case no. 24092, RT peak 5.15

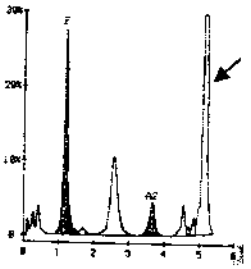
HbC



Case no. 25072, RT peak 5.15

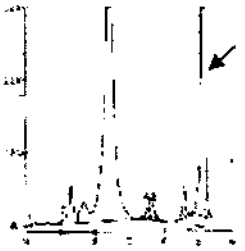
HbC

ภาพที่ 9 (ต่อ)



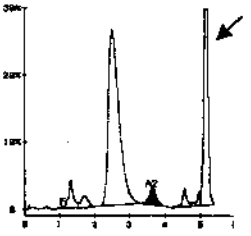
Case no. 32088, RT peak 5.15

HbC



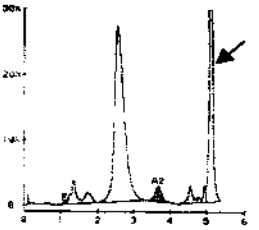
Case no. 25512, RT peak 5.16

HbC



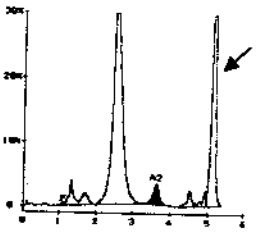
Case no. 30940, RT peak 5.16

HbC



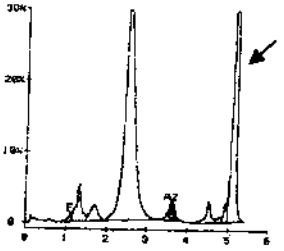
Case no. 31112, RT peak 5.16

HbC



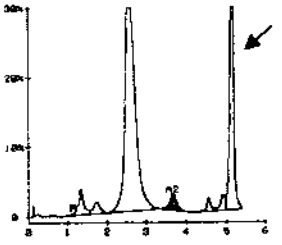
Case no. 32044 RT peak 5.16

HbC



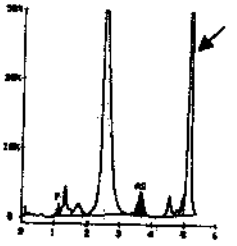
Case no. 32471, RT peak 5.16

HbC



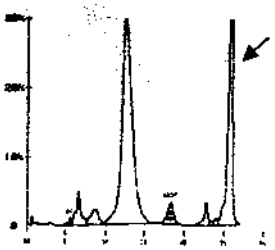
Case no. 33426, RT peak 5.16

HbC



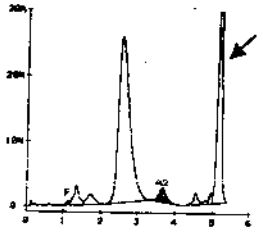
Case no. 34588, RT peak 5.16

HbC



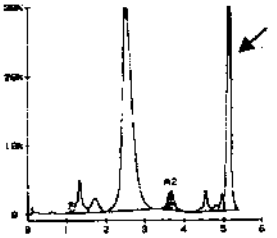
Case no. 34793, RT peak 5.16

HbC



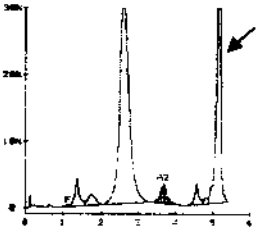
Case no. 31043, RT peak 5.17

HbC



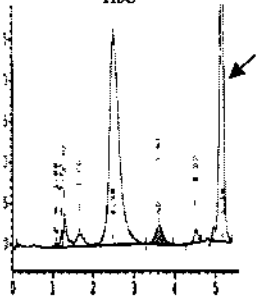
Case no. 33136, RT peak 5.17

HbC



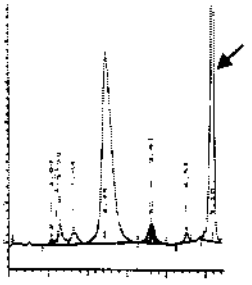
Case no. 33718, RT peak 5.17

HbC



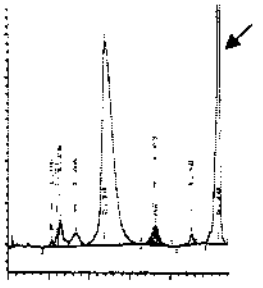
Case no. 38651, RT peak 5.18

HbC



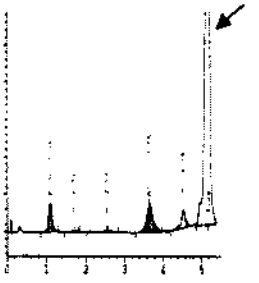
Case no. 38943, RT peak 5.18

HbC



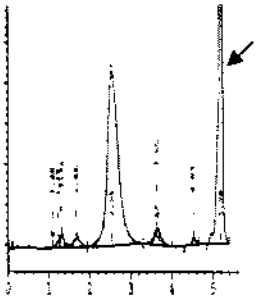
Case no. 39402, RT peak 5.18

HbC



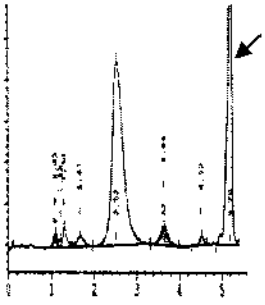
Case no. 40064, RT peak 5.20

HbC



Case no. 40173, RT peak 5.20

HbC



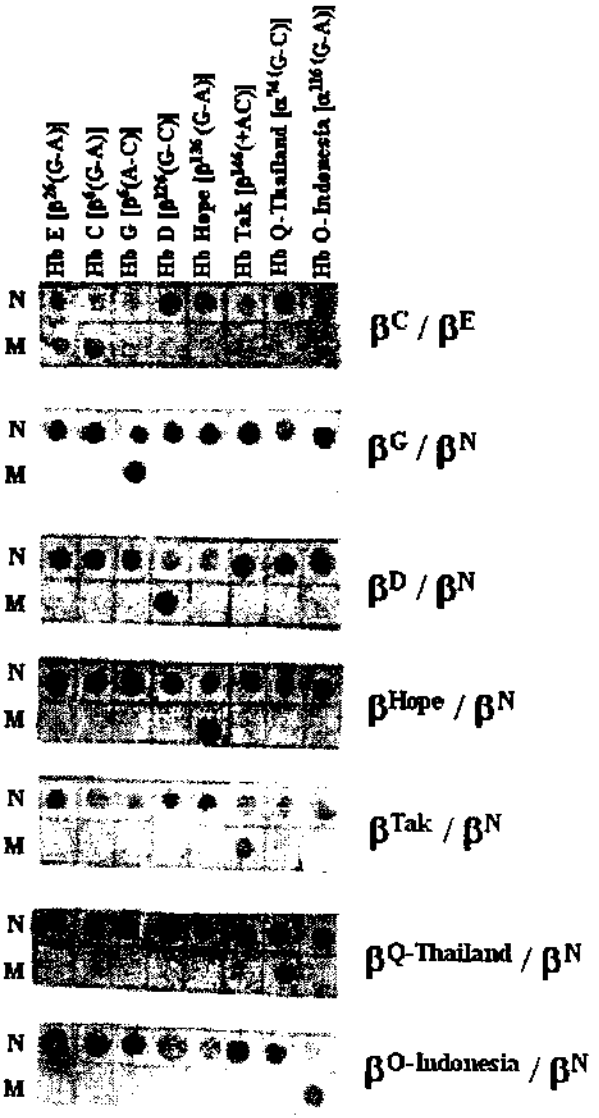
Case no. 40444, RT peak 5.20

HbC

ภาพที่ 9 (ต่อ)

3. การพัฒนาวิธีการตรวจฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น

จากผลการตรวจหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดด้วยวิธีการตรวจหาลำดับเบส ด้วยเครื่องมืออัตโนมัติจากข้อ 2 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ได้ 7 ชนิด คือ ฮีโมโกลบินชนิดซี, ฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab, ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar, ฮีโมโกลบินชนิดดาก, ฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand, ฮีโมโกลบินชนิด O-Indonesia และฮีโมโกลบินชนิด Hope ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ภาพแสดงผลการตรวจฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น
แถวบนของแถบทดสอบ N คือ ตัวตรวจจับปกติ (normal probe) ของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด
แถวล่างของแถบทดสอบ M คือ ตัวตรวจจับที่ผิดปกติ (mutant probe) ของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด

4. การคำนวณค่าทางสถิติ

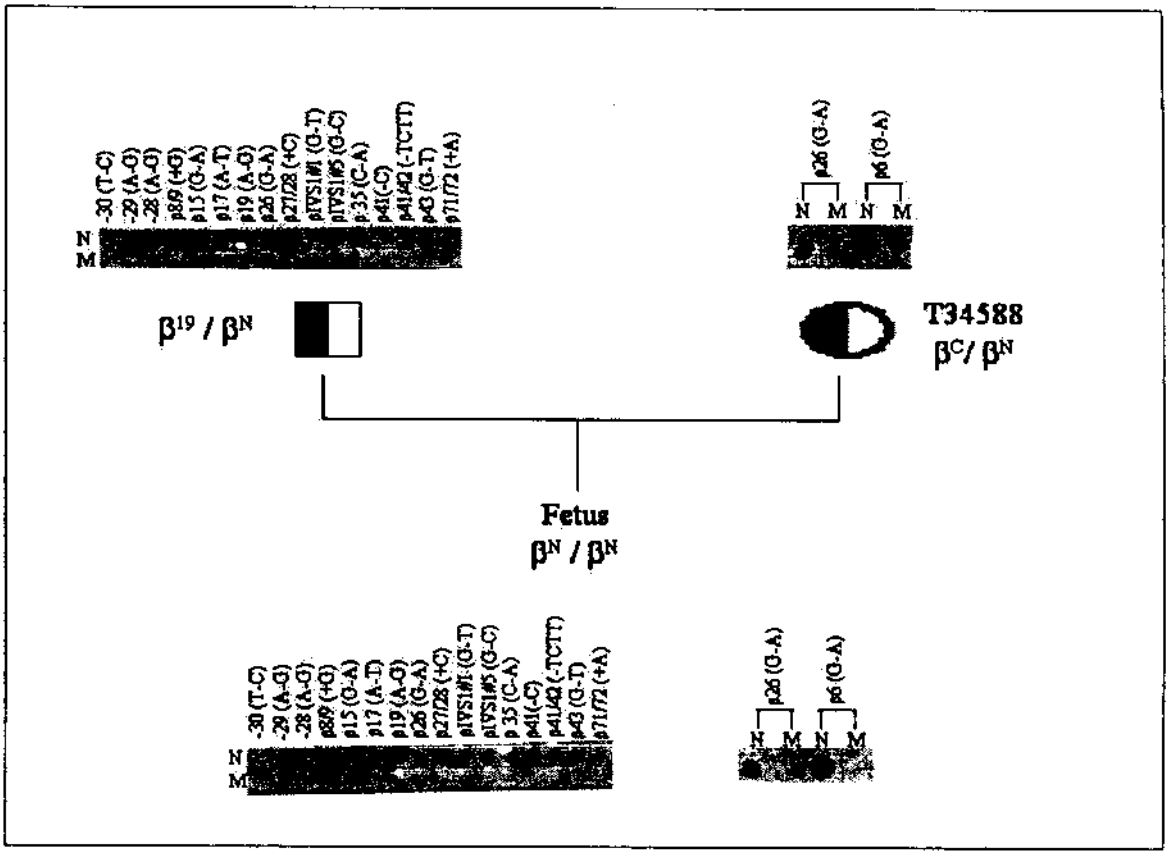
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดด้วยการคำนวณหาค่าความแตกต่างด้วยสถิติ non-parametric kruskal wallis test ดังตารางที่ 7 พบว่า ค่าเฉลี่ยของค่า Rbc, MCV และ MCHC ของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

5. การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคเบต้า-ธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบินผิดปกติ

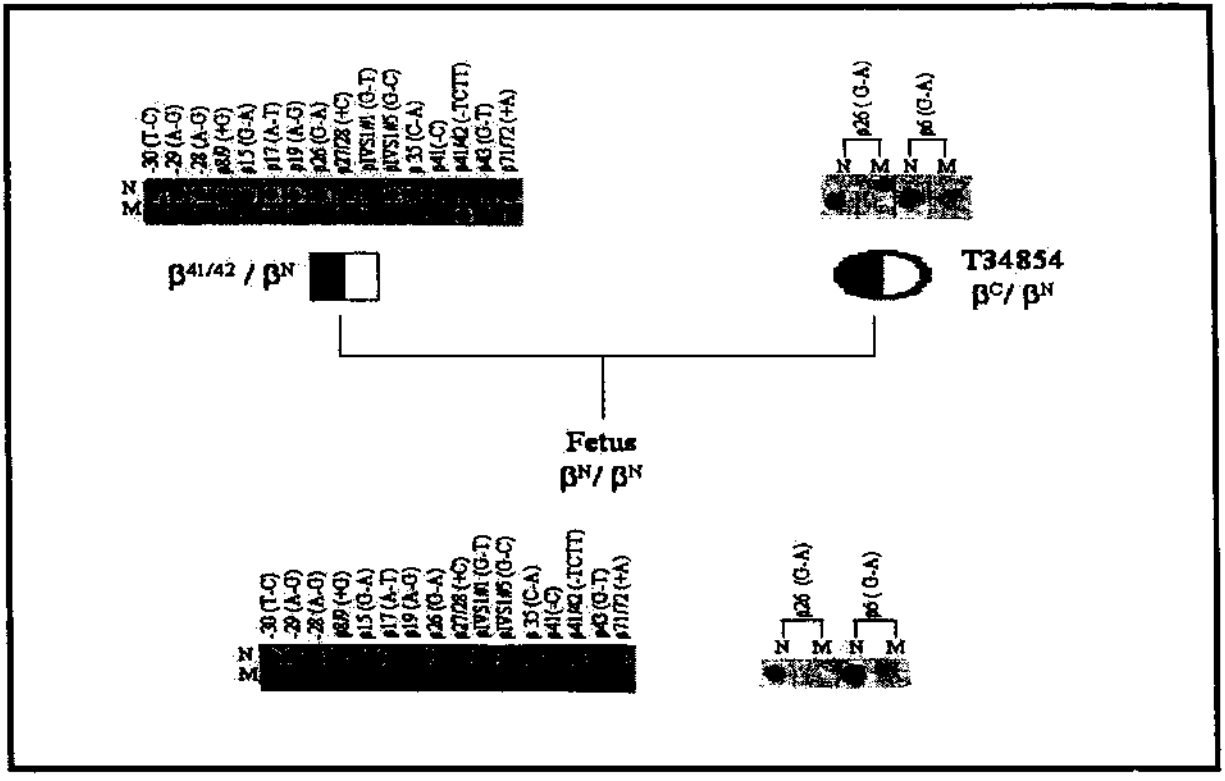
จากการพัฒนาวิธีการตรวจฮีโมโกลบินผิดปกติด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น สามารถนำมาใช้ในตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดให้กับคู่สามี-ภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบินชนิดซี 2 ราย ผลการตรวจพบว่าทารกทั้ง 2 รายให้ผลปกติ ไม่เป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบินชนิดซี และตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดให้กับคู่สามี-ภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตรมียีนฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar ร่วมกับฮีโมโกลบินชนิดอี 1 ราย ผลการตรวจพบว่าทารกเป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar ผลการตรวจวินิจฉัยแสดงในภาพที่ 11-13

ตารางที่ 7 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิด

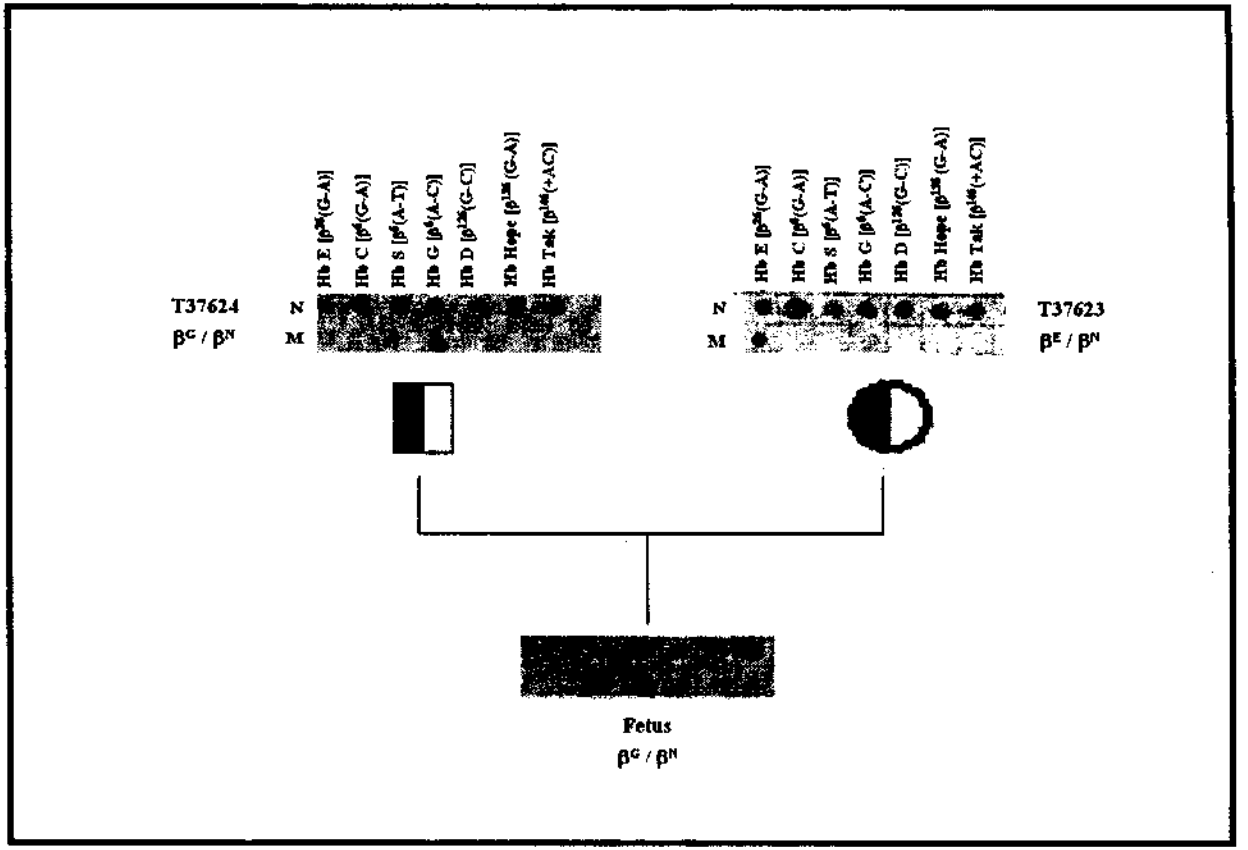
	N. (%)	Sex (M/F)	Age (year)	Rbc ($x10^6/mm^3$) mean±SD	Hb (g/dL) mean±SD	Hct (%) mean±SD	MCV (fL) mean±SD	MCH (pg) mean±SD	MCHC (g/dL) mean±SD	RDW-CV (%) mean±SD	% Hb variant mean±SD	RT-time (min.)
Hb C/N	26(50.0)	11/15	2-69	4.8±0.7	12.4±2.1	35.6±5.8	74.1±6.9	25.9±2.6	34.1±4.2	15.9±2.5	37.2±3.2	5.12-5.20
Hb D- Panjab/N	10(19.3)	4/6	19-37	5.1±0.8	13.4±2.4	41.1±7.4	80.7±6.1	26.3±1.4	33.0±1.5	15.9±1.2	37.3±2.6	4.01-4.16
Hb Tak/N	5 (9.6)	2/3	20-38	5.1±0.3	15.5±1.6	44.8±4.4	83.1±4.7	28.7±1.9	34.6±1.1	13.8±0.8	33.6±2.0	4.06-4.28
HbG-Makassar/N	4(7.7)	1/3	34-43	4.6±0.4	12.3±2.4	35.9±5.8	77.9±9.2	26.7±4.1	34.2±4.1	14.6±2.0	39.4±1.6	4.48-4.55
Hb Lepore/N	2(3.8)	1/1	17-28	4.8±0.5	11.1±1.3	34.5±4.9	72.0±2.8	23.3±0.5	32.3±0.6	17.2±1.3	13.3±1.6	3.45-3.48
HbQ-Thailand/N	2(3.8)	0/2	28-34	4.3±0.4	11.6±1.1	34.6±4.1	79.9±2.0	26.7±0.0	33.5±0.9	16.1±2.6	22.4±9.6	4.64-4.65
HbO-Indonesia/N	2(3.8)	0/2	23-34	4.5±1.3	11.3±1.4	34.8±5.9	78.6±8.7	25.6±4.0	32.5±1.5	14.0±0.4	13.9±8.8	4.84-4.95
Hb Hope/N	1(1.9)	0/1	60	4.3	8.7	28.0	64.7	20.5	31.6	12.3	6.9	3.68
Kruskal-wallis test				p=0.02			p=0.03		p=0.02			



ภาพที่ 11 ผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ของครอบครัว T34588 ทารกให้ผลปกติ (β^N/β^N)



ภาพที่ 12 ผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ของครอบครัว T34854 ทารกให้ผลปกติ (β^N/β^N)



ภาพที่ 13 ผลการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น ของครอบครัว T37624 ทารกให้ผลเป็นพาหะฮีโมโกลบินซนิด G-Makassar

ข้อวิจารณ์

เทคนิครีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก เหมาะสำหรับการตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติในกลุ่มประชากรที่มีความหลากหลายชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ เพราะสามารถตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินได้โดยการทดลองเพียงครั้งเดียว ในการวิจัยครั้งนี้รายงานผลเฉพาะฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นที่ไม่ใช่ชนิดฮีโมโกลบินอี ฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงค์ และฮีโมโกลบินเอช ซึ่งพบได้บ่อยในภูมิภาคอื่นๆของประเทศไทย รวมทั้งทางภาคใต้ของประเทศไทย พบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นๆอีก 8 ชนิด คือคือ ฮีโมโกลบินชนิดซี, ฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab, ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar, ฮีโมโกลบินชนิดตาก, ฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand, ฮีโมโกลบินชนิด O-Indonesia, ฮีโมโกลบินชนิด Hope และฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Hollandia

ฮีโมโกลบินชนิดซี เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 ของสายเบต้าโกลบิน จากกรดกลูตามิค เป็น กรดไลซีน ($\alpha_2\beta_2^{6Glu\text{-}Lys}$) และพบได้ 48.3% จากชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 5.12-5.20 ฮีโมโกลบินชนิดซีเคยมีรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2536 ในผู้ที่จากจังหวัดนครศรีธรรมราช [17, 32] ต่อมามีรายงานการค้นพบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 15 ราย [18] แต่ไม่มีรายงานการพบในส่วนของภาคกลางเลย [33] ฉะนั้นชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติอาจจะมีความแตกต่างกันในแง่ของการกระจายตัวตามภูมิภาค อาการของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิดซีจะไม่มีอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ และบางคนอาจจะมีอาการไม่รุนแรงจนถึงรุนแรงถ้าหากมียีนร่วมกับยีนเบต้า-ธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง [34] ฉะนั้นควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมในแง่ของอาการของโรคในกรณีที่ผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิดซีแต่งงานกับผู้ที่มียีนเบต้า-ธาลัสซีเมียชนิดต่างๆว่าอาการของโรคจะรุนแรงหรือไม่

ฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 121 ของสายเบต้าโกลบิน จากกรดกลูตามิค เป็น กรดกลูตามีน ($\alpha_{22}^{6Glu\text{-}Gln}$) พบเป็นอันดับสอง 20.7% เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 4.01-4.16 ฮีโมโกลบินชนิดนี้สามารถพบได้ในกลุ่มประชากรเชื้อสายไทย, อินเดีย และชาวยิว-บัลกาเรียน [3, 26, 33, 35, 36] จำนวนที่พบฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab ในแต่ละภาคของประเทศไทยแตกต่างกัน ในภาคกลางมีรายงานว่าพบแล้วจำนวน 4 ราย [26, 33] ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีรายงานว่าพบแล้วจำนวน 9 ราย [3] อาการของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab จะไม่มีอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพเช่นกัน

ฮีโมโกลบินชนิดตาก เกิดจากการที่มีนิวคลีโอไทด์ AC แทรกเข้ามาที่ตำแหน่ง terminator codon ของยีนเบต้า-โกลบิน ทำให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนยาวออกไปอีก 11 ตัว เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 4.06-4.28 ฮีโมโกลบินชนิดตากพบได้กลุ่มประชากรเชื้อสายไทย, มาเลเซีย, และไต้หวัน [4, 33, 37-39] ในคนไทยสามารถพบได้ทั้งคนที่อาศัยอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย อาการของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิดตากมีดั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงมีอาการ polycythemia สำหรับผู้ที่มียีนฮีโมโกลบินชนิดตากช่วงที่เป็นเด็กทารก เนื่องจากภาวะที่มีออกซิเจนสูงในกระแสเลือด

ฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab และฮีโมโกลบินชนิดดาก เมื่อแยกชนิดด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินผิดปกติกลุ่มนี้จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยสังเกตจาก retention time (RT) ฉะนั้นการวิเคราะห์หาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติโดยวิธีนี้จึงยังมีข้อจำกัดและแปลผลผิดพลาดได้ การวิเคราะห์ด้วยวิธีรีเวอร์ส ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น จะทำให้สามารถระบุชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติได้อย่างแม่นยำ เพราะเป็นการวิเคราะห์ถึงระดับยีนที่มีตัวตรวจจับที่เฉพาะภายใต้การทดลองเพียงครั้งเดียว ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาฮีโมโกลบินผิดปกติ นอกเหนือจากวิธี multiplex allele-specific PCR assay [6] ที่เคยมีรายงานมาแล้ว

ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 ของสายเบต้าโกลบินจากกรดกลูตามิค เป็น กรดอะลานีน ($\alpha_2\beta_2^{6Glu\text{-}Ala}$) มีรายงานครั้งแรกในชาวอินโดนีเซีย [40] และต่อมาได้มีการรายงานในประเทศไทยจำนวน 6 ราย ซึ่งเป็นคนที่มีภูมิลำเนามาจากทางภาคใต้ 1 คน [20, 21] เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 4.48-4.55 ผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab จะไม่พบอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ ยกเว้นเมื่อตรวจเลือดจะพบว่าค่า MCV จะต่ำกว่าปกติเล็กน้อยคืออยู่ในช่วง 77.9±9.2 fL

ฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand (ฮีโมโกลบินมหิดล หรือ ฮีโมโกลบินชนิด G-Taichung) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 74 ของสายแอลฟ่าโกลบิน จากกรดแอสพาติค เป็น กรดฮีสติดีน ($\alpha_2^{74Asp\text{-}His}\beta_2$) เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 4.64-4.65 พบได้ในกลุ่มประชากรเชื้อสายไทย, จีน [2, 41-44] ผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิด Q-Thailand ไม่พบอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ

ฮีโมโกลบินชนิด O-Indonesia เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 116 ของสายแอลฟ่าโกลบินจากกรดกลูตามิค เป็น กรดไลซีน ($\alpha_2^{116Glu\text{-}Lys}\beta_2$) พบรายงานในกลุ่มประชากรชาวอินโดนีเซีย [45] ยังไม่เคยพบรายงานมาก่อนในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้พบผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิด O-Indonesia 2 ราย ซึ่งทั้งสองรายมีเชื้อสายมุสลิม จากจังหวัดยะลาและนราธิวาส การค้นพบนี้บอกได้ว่าฮีโมโกลบินชนิด O-Indonesia ที่พบในประเทศไทยและประเทศอินโดนีเซียอาจจะมีการกระจายตัวมาจากจุดกำเนิดเดียวกัน เนื่องจากลักษณะการแสดงออกทางอาการคล้ายคลึงกับกลุ่มประชากรที่พบในประเทศอินโดนีเซีย คือจะไม่แสดงอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพและผลการตรวจเลือดทางโลหิตวิทยาค่า Hb อยู่ระหว่าง 11.3±1.4 g/dL ค่า MCV อยู่ระหว่าง 78.6±8.7 fL [46] และเมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 4.84-4.95

ฮีโมโกลบินชนิด Hope เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 136 ของสายเบต้าโกลบินจากกรดไกลซีน เป็น กรดแอสพาติค ($\alpha_2\beta_2^{136Gly\text{-}Asp}$) เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 3.68 พบรายงานในกลุ่มประชากรชาวไทย, สเปน, อเมริกา, แอฟริกา, ญี่ปุ่น, [33, 47-52] ในประเทศไทยสามารถพบฮีโมโกลบินชนิด Hope ได้ทั้งภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ แต่ทางภาคใต้พบใน

ปริมาณที่น้อยกว่าภาคกลาง และภาคเหนือ จากการศึกษาครั้งนี้พบเพียงแค่ 1 ราย ผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิดนี้ไม่พบอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ

ฮีโมโกลบินชนิด Lepore เกิดจากการ crossing over ของสายเดลต้าโกลบินกับสายของเบต้าโกลบินทำให้เกิดฮีโมโกลบินผิดปกติ และเมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β-thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 3.45-3.48 ปัจจุบันพบฮีโมโกลบินชนิด Lepore จำนวน 3 แบบ คือ ฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Hollandia เกิดจากการ crossing over ของยีนเดลต้าที่ตำแหน่งโคดอน 1-22 และยีนเบต้าที่ตำแหน่งโคดอน 50-146 ($\delta^{aa1-22}\beta^{aa50-146}$), ฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Baltimore เกิดจากการ crossing over ของยีนเดลต้าที่ตำแหน่งโคดอน 1-50 และยีนเบต้าที่ตำแหน่งโคดอน 86-146 ($\delta^{aa1-50}\beta^{aa86-146}$) และฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Boston-Washington เกิดจากการ crossing over ของยีนเดลต้าที่ตำแหน่งโคดอน 1-87 และยีนเบต้าที่ตำแหน่งโคดอน 116-146 ($\delta^{aa1-87}\beta^{aa116-146}$) งานวิจัยครั้งนี้พบฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Hollandia เกิดจากการ crossing over ของยีนเดลต้าที่ตำแหน่ง IVS1-42 และยีนเบต้าที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 56 ($\delta^{IVS1-42}\beta^{56}$) จำนวน 2 ราย ซึ่งฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Hollandia ชนิดนี้เคยมีรายงานครั้งแรกในคนไทยที่พบในประเทศฮ่องกงแต่ไม่ได้รายงานว่าคนไข้เป็นคนไทยจากภูมิภาคใด ก่อนหน้านี้ในประเทศไทยเคยพบฮีโมโกลบินชนิด Lepore-Hollandia ในคนไทยภาคกลางแต่ตำแหน่งที่เกิด crossing over แตกต่างกันคือ เกิดจากการ crossing over ของยีนเดลต้าที่ตำแหน่งโคดอน 22 และยีนเบต้าที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 50 ($\delta^{22}\beta^{50}$)[53] ผลการตรวจเลือดทางโลหิตวิทยาพบว่าค่า MCV จะมีค่าต่ำกว่าปกติอยู่ระหว่าง 72.0±2.8 fL

จากงานวิจัยครั้งนี้จะเห็นได้ว่าค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ที่เป็นพาหะของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดจะไม่แตกต่างกันมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยกเว้นค่าความเข้มข้นของมีดเลือดแดง, ค่า MCV และค่า MCHC ที่ให้ค่า p=0.02, p=0.03 และ p=0.02 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อคำนวณด้วยสถิติ Kruskal-wallis ที่ใช้สำหรับการหาค่าความแตกต่างของข้อมูลที่เป็นแบบ non-parametric แต่เนื่องจากจำนวนข้อมูลในแต่ละชนิดมีน้อย ค่าที่ได้จึงอาจจะไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาถึงลักษณะการแสดงออกทาง phenotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดได้

นอกจากนี้ ผลการวิจัยครั้งนี้ยังได้นำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดให้กับคู่เสี่ยงที่มีโอกาสมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบินผิดปกติได้ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Hardison, R.C., et al., *HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server.* Hum Mutat, 2002. 19(3): p. 225-33.
2. Fucharoen, S. and P. Winichagoon, *Hemoglobinopathies in Southeast Asia.* Hemoglobin, 1987. 11(1): p. 65-88.
3. Fucharoen, S., et al., *Molecular characterization of Hb D-Punjab [beta121(GH4)Glu-->Gln] in Thailand.* Hemoglobin, 2002. 26(3): p. 261-9.
4. Fucharoen, S., et al., *Molecular and hematological characterization of Hb Tak and Hb Pyrgos in Thailand.* Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1997. 28 Suppl 3: p. 110-4.
5. Winichagoon, P., et al., *Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by reverse dot-blot hybridization.* Prenat Diagn, 1999. 19(5): p. 428-35.
6. Sanchaisuriya, K., et al., *Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak.* Clin Chim Acta, 2004. 343(1-2): p. 129-34.
7. Zeng, Y.T., et al., *Identification of Hb D-Punjab gene: application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobins.* Am J Hum Genet, 1989. 44(6): p. 886-9.
8. Fucharoen, S., et al., *Compound heterozygote states for Hb C/Hb Malay and Hb C/Hb E in pregnancy: a molecular and hematological analysis.* Blood Cells Mol Dis, 2005. 35(2): p. 196-200.
9. Fucharoen, S., V. Thonglairuam, and P. Winichagoon, *Hematologic changes in alpha-thalassemia.* Am J Clin Pathol, 1988. 90(2): p. 193-6.
10. Sae-Ung, N., et al., *alpha-Thalassemia and Related Disorders in Northeast Thailand: A Molecular and Hematological Characterization.* Acta Haematol, 2006. 117(2): p. 78-82.
11. Fucharoen, S., et al., *Complex interaction of Hb Hekinan [alpha27(B8) Glu-Asp] and Hb E [beta26(B8) Glu-Lys] with a deletional alpha-thalassemia 1 in a Thai family.* Eur J Haematol, 2003. 70(5): p. 304-9.
12. Svasti, J., et al., *Identification of Hb Anantharaj [alpha 11(A9)Lys->Glu] as Hb J-Wenchang-Wuming [alpha 11(A9)Lys->Gln].* Hemoglobin, 1993. 17(5): p. 453-5.
13. Fucharoen, S., et al., *Rapid molecular characterization of Hb Queens and Hb Siam: two variants easily misidentified as sickle Hb.* Clin Biochem, 2007. 40(1-2): p. 137-40.
14. Pootrakul, S. and G.H. Dixon, *Hemoglobin Mahidol: a new hemoglobin alpha-chain mutant.* Can J Biochem, 1970. 48(9): p. 1066-78.
15. Sanguansermsri, T., et al., *Hemoglobin Suan-Dok (alpha 2 109 (G16) Leu replaced by Arg beta 2): an unstable variant associated with alpha-thalassemia.* Hemoglobin, 1979. 3(2): p. 161-74.

16. Thonglairoam, V., et al., *Hemoglobin constant spring in Bangkok: molecular screening by selective enzymatic amplification of the alpha 2-globin gene.* Am J Hematol, 1991. 38(4): p. 277-80.

17. Siriboon, W., et al., *Identification of Hb C [beta 6(A3)Glu-->Lys] in a Thai male.* Hemoglobin, 1993. 17(5): p. 419-25.

18. Sanchaisuriya, K., et al., *Molecular characterization of hemoglobin C in Thailand.* Am J Hematol, 2001. 67(3): p. 189-93.

19. Changtrakul, Y., et al., *Identification of Hb S in Thai patients.* Songkla Med J, 2002. 20: p. 201-9.

20. Sangkitporn, S., et al., *Hb G Makassar (beta 6:Glu-Ala) in a Thai family.* J Med Assoc Thai, 2002. 85(5): p. 577-82.

21. Viprakasit, V., et al., *Hb G-Makassar [beta6(A3)Glu-->Ala; codon 6 (GAG-->GCG)]: molecular characterization, clinical, and hematological effects.* Hemoglobin, 2002. 26(3): p. 245-53.

22. Tuchinda, S., D. Beale, and H. Lehmann, *A New Haemoglobin in a Thai Family. A Case of Haemoglobin Siriraj-Beta Thalassaemia.* Br Med J, 1965. 1(5450): p. 1583-5.

23. Fucharoen, S., et al., *Molecular characterization of thalassemia intermedia with homozygous Hb Malay and Hb Malay/HbE in Thai patients.* Haematologica, 2001. 86(6): p. 657-8.

24. Fucharoen, S., et al., *Molecular and haematological characterization of compound Hb E/Hb Pyrgos and Hb E/Hb J-Bangkok in Thai patients.* Clin Lab Haematol, 2005. 27(3): p. 184-9.

25. Fucharoen, S., et al., *Atypical hemoglobin H disease in a Thai patient resulting from a combination of alpha-thalassemia 1 and hemoglobin Constant Spring with hemoglobin J Bangkok heterozygosity.* Eur J Haematol, 2001. 66(5): p. 312-6.

26. Wasi, P., et al., *Haemoglobin D-beta Los Angeles (D Punjab, alpha-2-beta-2 121 Glu NH2) in a Thai family.* Acta Haematol, 1968. 39(3): p. 151-8.

27. Moghimi, B., et al., *Hb Dhonburi (Neapolis) [beta126(H4)Val-->Gly] identified in a family from northern Iran.* Hemoglobin, 2004. 28(4): p. 353-6.

28. Viprakasit, V. and W. Chinchang, *Two independent origins of Hb Dhonburi (Neapolis) [beta 126 (H4) Val-->Gly]: An electrophoretically silent hemoglobin variant.* Clin Chim Acta, 2007. 376(1-2): p. 179-83.

29. Tamary, H., et al., *Systematic use of automated fluorescence-based sequence analysis of amplified genomic DNA for rapid detection of point mutations.* Am J Hematol, 1994. 46(2): p. 127-33.

30. Nopparatana, C., et al., *Automate DNA sequence analysis of beta-globin gene*, in *The detection of single base mutations: A laboratory manual.*, W.P. Fucharoen S, Kattamis C, Bernini L, Editor. 1994: bangkok. p. 90-94.

31. Cai, S.P., et al., *Reverse dot blot probes for the screening of beta-thalassemia mutations in Asians and American blacks.* Hum Mutat, 1994. 3(1): p. 59-63.
32. Siriboon, W., et al., *Discovery of a New Hemoglobin C Mutation in Thailand* . Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications. 1995: Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok. 159-163.
33. Uaprasert, N., et al., *Clinical and hematological characteristics of uncommon beta-globin variants in Thailand.* Int J Hematol, 2009. 89(5): p. 568-71.
34. Old, J.M., *Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders.* Blood Rev, 2003. 17(1): p. 43-53.
35. Ropero, P., et al., *[The association of beta zero-thalassemia and Hb D Punjab in a family of Indian origin. The second case reported in Spain].* Med Clin (Barc), 1997. 108(10): p. 385-8.
36. Ramot, B., et al., *Hemoglobin D Punjab in a Bulgarian Jewish family.* Isr J Med Sci, 1969. 5(5): p. 1066-70.
37. Lie-Injo, L.E., et al., *Red cell metabolism and severe neonatal jaundice in West Malaysia.* Acta Haematol, 1977. 58(3): p. 152-60.
38. Lie-Injo, L.E., et al., *Hemoglobin Tak in a newborn Malay.* Hemoglobin, 1977. 1(8): p. 747-57.
39. Shih, M.C., et al., *Hb Tak: a beta chain elongation at the end of the beta chain, in a Taiwanese.* Hemoglobin, 2005. 29(1): p. 65-7.
40. Blackwell, R.Q., et al., *Hemoglobin G Makassar: beta-6 Glu leads to Ala.* Biochim Biophys Acta, 1970. 214(3): p. 396-401.
41. Zeng, F.Y., et al., *Hb Q-Thailand [alpha 74(EF3)Asp-->His]: gene organization, molecular structure, and DNA diagnosis.* Hemoglobin, 1992. 16(6): p. 481-91.
42. Winichagoon, P., et al., *The molecular basis of alpha-thalassaemia in Thailand.* Embo J, 1984. 3(8): p. 1813-8.
43. Liao, C., J. Li, and D. Li, *Association of beta-thalassemia and Hb Q-Thailand resulting in a normal Hb A2 value.* Hemoglobin, 2008. 32(5): p. 505-8.
44. Li, D., et al., *Association of Hb Q-Thailand with heterozygous Hb E in a Chinese patient.* Hemoglobin, 2008. 32(3): p. 319-21.
45. Marinucci, M., et al., *HB O Indonesia (alpha 2 116(GH4) Glu replaced by Lys beta 2) in association with beta thalassemia.* Hemoglobin, 1978. 2(1): p. 59-63.
46. Daud, D., et al., *The hemoglobin O mutation in Indonesia: distribution and phenotypic expression.* J Hum Genet, 2001. 46(9): p. 499-505.
47. Harano, T., et al., *Hb Hope [beta 136 (H 14) Gly leads to Asp] in a Japanese family.* Hemoglobin, 1983. 7(3): p. 263-5.

48. Labie, D., et al., *[Hemoglobinopathies in West-African immigrant workers in France (author's transl)].* Sem Hop, 1978. 54(43-44): p. 1343-6.

49. Sura, T., et al., *Haemoglobin Hope in a northern Thai family: first identification of homozygous haemoglobin Hope associated with haemoglobin H disease.* Eur J Haematol, 2007. 79(3): p. 251-4.

50. Beneitez, D., et al., *Heterozygous Hb Hope [beta*136(*H*14)*Gly --> Asp] in association with heterozygous beta*0*-thalassemia with apparent homozygous expression, in a Spanish patient.* Hemoglobin, 2006. 30(1): p. 45-9.

51. Chunpanich, S., et al., *Molecular and hematological characterization of hemoglobin Hope/hemoglobin E and hemoglobin Hope/alpha-thalassemia* 2 *in Thai patients.* Lab Hematol, 2004. 10(4): p. 215-20.

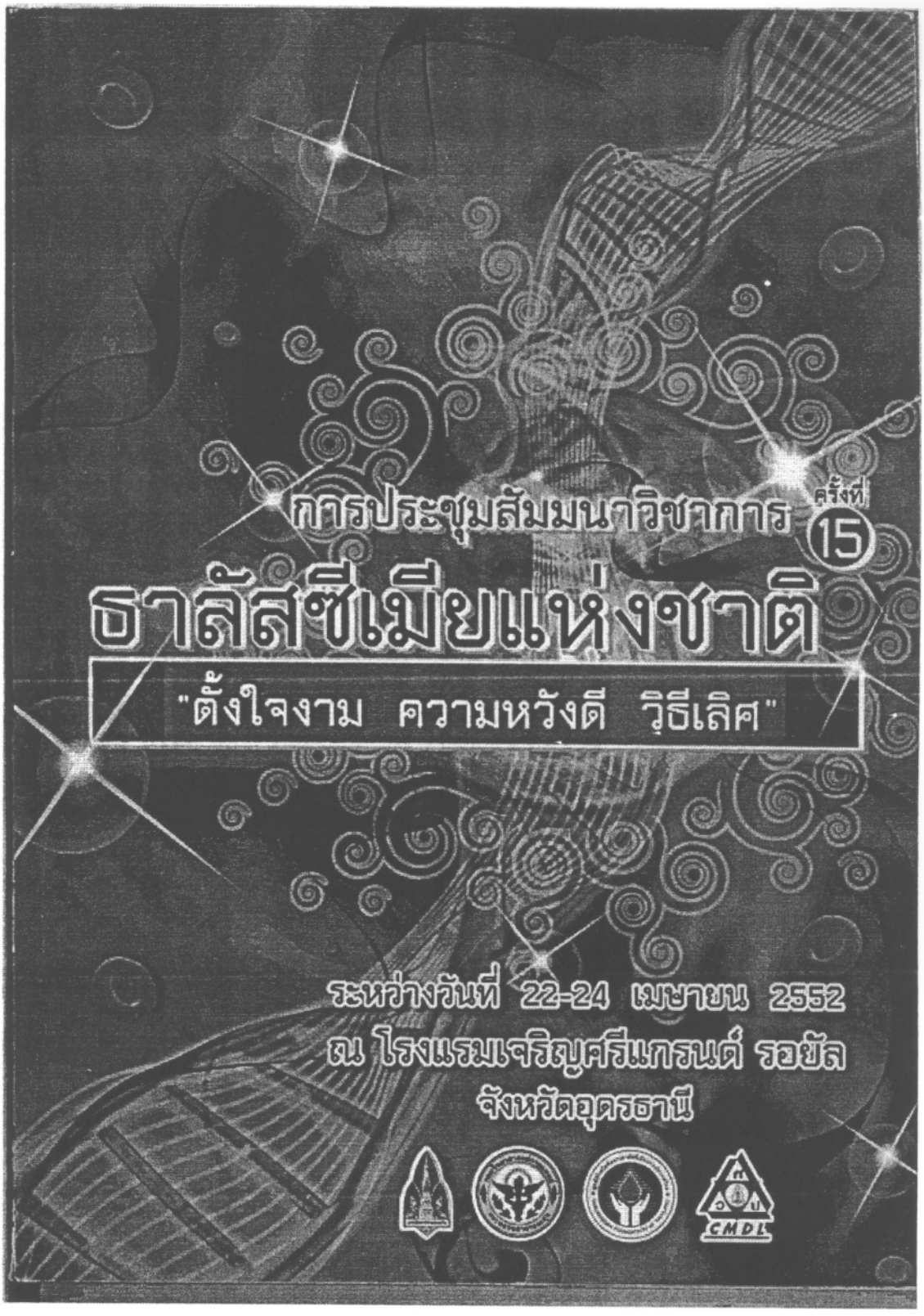
52. Minnichi, V., et al., *Hemoglobin Hope: a Beta Chain Variant.* Blood, 1965. 25: p. 830-8.

53. Viprakasit, V., et al., *Complex interactions of deltabeta hybrid haemoglobin (Hb Lepore-Hollandia) Hb E (beta(*26*G-->A)) and alpha+ thalassaemia in a Thai family.* Eur J Haematol, 2002. 68(2): p. 107-11.

ภาคผนวก

Outputs

1. Saechan V., Nopparatana Ch., Nopparatana C. and Fucharoen S. (2009). Molecular Analysis of Abnormal Hemoglobin in Southern Thailand In *15th National Thalassemia meeting*. Chroensri-Grand Royal hotel, Udonthani. pp. 99. (Oral presentation)
2 Saechan V., Nopparatana Ch., Nopparatana C. and Fucharoen S. (2009). Molecular Analysis of Abnormal Hemoglobin in Southern Thailand In *25th Annual Academic Meeting*. Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Songkhla. M106-6. (oral presentation)


การประชุมสัมมนาวิชาการ
ครั้งที่ 15
ธาลัสซีเมียแห่งชาติ
"ตั้งใจงาม ความหวังดี วิธีเลิศ"
ระหว่างวันที่ 22-24 เมษายน 2552
ณ โรงแรมเจริญศรีแกรนด์ รอยัล
จังหวัดอุดรธานี
CMDL

O 04

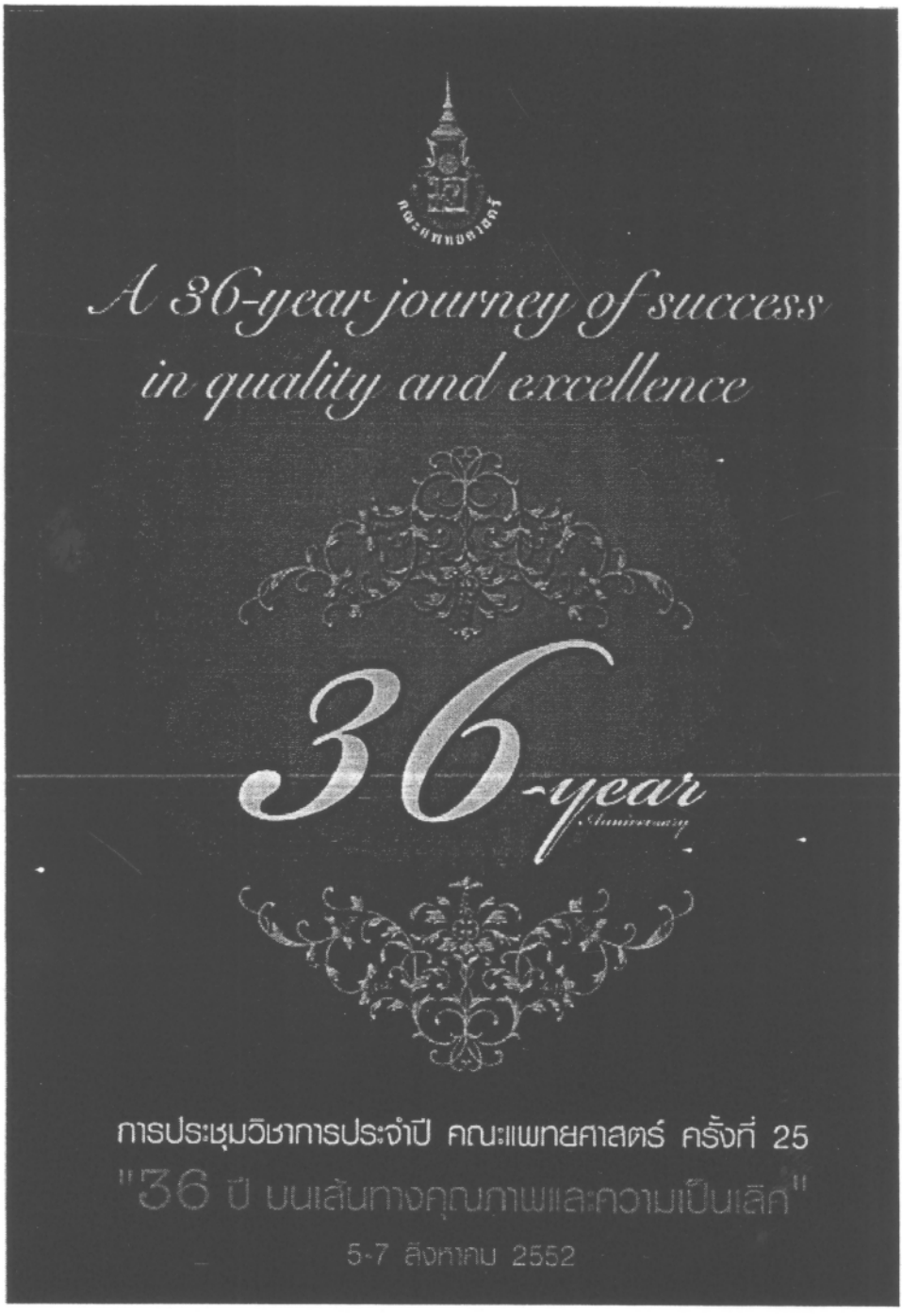
Molecular analysis of abnormal hemoglobin in southern Thailand

Saechan, V.[1*], Nopparatana, Ch.[1], Nopparatana, C.[1], Fucharoen, S.[2]

[1] *Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Thailand*

[2] *Thalassemia Research Center and Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Hemoglobinopathy (abnormal hemoglobin or hemoglobin variant) is an inherited disorder that results in abnormal structure of globin chains of the hemoglobin (Hb) molecule. Many abnormal Hbs have been characterized worldwide, including more than 14 variants in Thailand. The Bio-Rad Variant II HPLC system is used for investigating hemoglobin variants at Songklanagarind Hospital. This system has been shown to be a sensitive, specific and reproducible method, but some Hb variants such as Hb Tak and HbD-Punjab cannot, as yet, be clearly separated by this method. The aim of this study was to investigate the prevalence of hemoglobinopathy in southern Thailand using molecular analysis. A total of 50 abnormal Hbs were obtained from blood samples undergoing routine hemoglobin typing at Songklanagarind Hospital. Genomic DNAs were extracted from the samples and the globin genes analyzed using PCR-direct sequencing and reverse dot blot hybridization. This molecular analysis revealed six abnormal Hbs: 22 HbC, 11 HbD-Panjab, 7 HbTak, 3 HbG-Makassar, 2 Hb Lepore-Hollandia, and 1 Hb Hope. Four samples are unidentified and will be subjected for further analysis. During the study, the test was also applied to fetal diagnosis of 2 couples at risk of beta-thalassemia with HbC disease. The result showed normal genotype in both fetuses. This confirms that the analysis system is useful for characterization of abnormal Hb, including screening for thalassemia, which is endemic in Thailand.


A 36-year journey of success
in quality and excellence
36-year
Anniversary
การประชุมวิชาการประจำปี คณะแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 25
"36 ปี บนเส้นทางคุณภาพและความเป็นเลิศ"
5-7 สิงหาคม 2552

Oral Presentation : M106-6

Molecular Analysis of Abnormal Hemoglobin in Southern Thailand

Vannarat Saechan[1], Chawadee Nopparatana[1], Chamnong Nopparatana[1], Suthat Fucharoen[2]

[1]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla and [2]Thalassemia Research Center and Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Introduction: Hemoglobinopathy (abnormal hemoglobin or hemoglobin variant) is an inherited disorder that results in abnormal structure of globin chains of the hemoglobin (Hb) molecule. Many abnormal Hbs have been characterized worldwide, including more than 14 variants in Thailand. The Bio-Rad Variant II HPLC system is used for investigating hemoglobin variants at Songklanagarind Hospital. This system has been shown to be a sensitive, specific and reproducible method, but some Hb variants such as Hb Tak and HbD-Punjab cannot, as yet, be clearly separated by this method.

Objective: To investigate the prevalence of hemoglobinopathy in southern Thailand using molecular analysis.

Material and Method: A total of 58 abnormal Hbs were obtained from blood samples undergoing routine hemoglobin typing at Songklanagarind Hospital. Genomic DNAs were extracted from the samples and the globin genes analyzed using PCR-direct sequencing and reverse dot blot hybridization.

Results: The molecular analysis revealed fifty-eight abnormal Hbs: 28 HbC, 12 HbD-Panjab, 7 HbTak, 4 HbG-Makassar, 2 Hb Lepore-Hollandia, 2 Hb Q-Thailand, 2 Hb O-Indonesia and 1 Hb Hope. During the study, the test was also applied to fetal diagnosis of 2 couples at risk of beta-thalassemia with HbC disease. The result showed normal genotype in both fetuses.

Conclusion: Reverse dot blot hybridization for detection of abnormal hemoglobin is useful for characterization of abnormal hemoglobin types, including prenatal diagnosis of thalassemia with abnormal hemoglobin, which is endemic in Thailand

Keywords: Abnormal hemoglobin, hemoglobin variant, molecular diagnosis, reverse dot blot hybridization, Thailand.