ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ที่ยังไม่ทราบชนิดในภาคใต้ของประเทศไทย

Identification of Uncharacterized Point Mutations of β-thalassemia in Southern Thailand

พจนันท์ ทองจันทร์

Pojjanan Thongjan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Molecular Biology and Bioinformatics

Prince of Songkla University

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่ยังไม่ทราบชนิดในภาคใต้ของประเทศไทย

ผู้เขียน นางสาวพจนันท์ ทองจันทร์

สาขาวิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำนงค์ นพรัตน์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร สุวิวัฒน์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่ยังไม่ทราบชนิดในภาคใต้ของประเทศไทย
ผู้เขียน นางสาวพจนันท์ ทองจันทร์
สาขาวิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

บีตาธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมและมีการถ่ายทอดแบบ autosomal recessive เกิดจากการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินลดลง หรือสังเคราะห์ไม่ได้เลย ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ภาคใต้ของประเทศไทยพบพาหะของบีตาธาลัสซีมีร้อยละ 2-4 และมีประมาณร้อยละ 3 ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ คือ ตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ในผู้ป่วย โดยการออกแบบ oligonucleotide probe สำหรับวิธี Reverse Dot Blot Hybridization จำนวน 12 ชนิด คือ -31 (A-G), cap site +1 (A-C), Ini. nt2 (T-G), codon14/15 (+G), codon15 (-T), codon26 (G-T), IVS1 nt1 (G-A), codon35 (C-A), codon95 (+A), codon123-125 (-ACCCCACC), codon126 (T-G) และ Poly A (AAA-AGA) ผลการศึกษาพบชนิดการกลายพันธุ์ 7 ชนิดในผู้ป่วย 24 ราย คือ -31 (A-G) จำนวน 2 ราย, Ini. nt2 (T-G) จำนวน 2 ราย, codon15 (-T) จำนวน 5 ราย, IVS1 nt1 (G-A) จำนวน 8 ราย, codon35 (C-A) จำนวน 2 ราย, codon123-125 (-ACCCCACC) จำนวน 2 ราย และ Poly A (AAA-AGA) 3 ราย ส่วนอีก 1 รายไม่สามารถตรวจด้วยวิธี reverse dot-blot hybridization ได้จึงใช้วิธี automate DNA sequencing พบชนิดการกลายพันธุ์ คือ Ini. nt2 (T-C) ซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรกในประเทศไทย จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบความถี่และชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการตรวจวินิจฉัยและวางแผนเพื่อป้องกันโรคบีตาธาลัสซีเมียต่อไป

Thesis Title	Identification of uncharacterized point mutations of β-thalassemia in Southern Thailand
Author	Miss Pojjanan Thongjan
Major Program	Molecular Biology and Bioinformatics
Academic Year	2011

ABSTRACT

β-thalassemia is a heterogeneous group of genetic disorders characterized by reduced or absent β-globin chain synthesis. It is mainly caused by point mutations of β-globin gene. In the south of Thailand, the gene frequency is about 2-4 % with 3 % of uncharacterized mutations. This study have objective to analyzed mutations from unknown cases by designing oligonucleotide probes for reverse dot blot hybridization to detect 12 rare point mutations of β-thalassemia including -31 (A-G), cap site +1 (A-C), Ini. nt2 (T-G), codon14/15 (+G), codon15 (-T), codon26 (G-T), IVS1 nt1 (G-A), codon35 (C-A), codon95 (+A), codon123-125 (-ACCCCACC), codon126 (T-G) and Poly A (AAA-AGA). The 7 rare point mutations were detected in 24 cases. They are 2 cases of -31 (A-G), 2 cases of Ini. nt2 (T-G), 5 cases of codon15 (-T), 8 cases of IVS1 nt1 (G-A), 2 cases of codon35 (C-A), 2 cases of codon123-125 (-ACCCCACC), and 3 case of Poly A (AAA-AGA). One case was unidentified and subjected to analyze by automated DNA sequencing. The mutation at Ini. nt2 (T-C)] has been detected, which is the first reported in Thailand. From this study we add more data to the spectrum of β-thalassemia in Thailand, which will be helpful in genetic diagnosis counseling and prevention planning of prenatal diagnosis program.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เพราะได้รับความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำนงค์ นพรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้ แนะนำเทคนิคต่างๆเกี่ยวกับการตรวจบีตาธาลัสซีเมีย ช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ แนะนำเอกสารเพื่อใช้ในการเขียนวิทยานิพนธ์ และชี้แนะแนวทางให้ตลอดระยะเวลาดำเนินงานจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วง และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร สุวิวัฒน์ และอาจารย์ ดร.อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์ ประธานกรรมการสอบและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ข้อเสนอแนะและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วรรณรัตน์ แซ่ชั่น และคุณศตรณ กาญจนโอภาส ที่คอยให้ความรู้ ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ คอยให้คำปรึกษา แนะนำ สอนเทคนิคต่างๆในระหว่างการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ หน่วยธาลัสซีเมีย หน่วยโลหิตวิทยา และหน่วยวิจัยอณูพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย รวมทั้งช่วยอำนวยความสะดวกด้านสารเคมี เครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆในการทำงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และบุคลากรภาควิชาชีววิทยาโมเลกุล และชีวสารสนเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้กำลังใจตลอดมา และขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัยสำหรับทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ครอบครัว ญาติพี่น้อง เพื่อนๆ และคนใกล้ชิดที่ส่งเสริมโอกาสการศึกษาและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัยจนประสบความสำเร็จในครั้งนี้

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนในการทำวิจัยจากกองทุนวิจัยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการวิจัย 52-057-05-2-3

พจนันท์ ทองจันทร์

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
รายการไดอะแกรมประกอบ	(10)
คำย่อและสัญลักษณ์	(11)
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	27
ผลการวิจัย	45
บทวิจารณ์ผลการวิจัย	59
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	63
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก	70
ประวัติผู้เขียน	75

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

บทที่ 1

1. กลไกการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดบีตาธาลัสซีเมีย และชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในคนไทย 5
2. ลักษณะความผิดปกติของการสังเคราะห์สายโกลบินในกลุ่มที่เป็นโรคและพาหะบีตาธาลัสซีเมียที่พบในคนไทย 9
3. ความถี่ของบีตาธาลัสซีเมียที่พบในประชากรไทยเปรียบเทียบแต่ละภูมิภาค 11
4. แสดง uncommon β-thalassemia mutation ที่เคยมีรายงานเพิ่มเติมในประเทศไทย 12

บทที่ 2

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบินและที่ใช้ในการทำ PCR sequencing 28
6. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ASO probe ที่ใช้ในการตรวจบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดด้วยวิธี reverse dot blot hybridization 29
7. แสดงส่วนประกอบของ PCR mixture ในหลอด microtube 37

บทที่ 3

8. ผลการตรวจเลือดจากเครื่องนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติและผลการตรวจปริมาณและชนิดฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง (HPLC) ของ unknown cases ทั้งหมด 25 ราย 45
9. แสดงค่าการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA จากเลือดตัวอย่างผู้ป่วยที่สกัดได้ 47
10. ผลการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียชนิดเฉพาะจุดที่ยังไม่ทราบชนิด และความถี่ของการกลายพันธุ์แต่ละชนิด 56
11. เปรียบเทียบความถี่และชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดของบีตาธาลัสซีเมียจากการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาในอดีตของภาคใต้ 57

รายการภาพประกอบ

รูปที่ **หน้า**

บทที่ 1

1. แสดงโครงสร้างของฮีโมโกลบินเอ (Hb A) 3
2. แสดง Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 15
3. แสดง Single-stranded conformation polymorphism (SSCP) 16
4. แสดงการติดตามการถ่ายทอดยีนบีตาโกลบินที่ผิดปกติในครอบครัว ที่มีลูกเป็น β-thalassemia / Hb E disease 18
5. เปรียบเทียบโครงสร้างของ dNTP และ ddNTP 20
6. แสดงหลักการของการตรวจหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxy terminator method หรือ chain termination 20
7. แสดงการตรวจชนิดการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินด้วยวิธี allele specific oligonucleotide (ASO) hybridization (dot blot hybridization) 21
8. แสดงการตรวจด้วยวิธี reverse dot blot hybridization เมื่อนำ biotinylated PCR product มาทำ hybridization กับ allele-specific oligonucleotide probe (ASO probe) 23
9. แสดงผลตัวอย่างการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินด้วยวิธี reverse dot blot hybridization 24

บทที่ 2

10. แสดงตัวอย่างการ dot oligonucleotide probes ระหว่าง normal probe และ mutant probe 39
11. แสดงตัวอย่างโครมาโตแกรมที่อ่านได้จากเครื่องอัตโนมัติผ่านทางจอคอมพิวเตอร์จากโปรแกรม Data analysis ของ ABI 43

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

บทที่ 3

12. แสดงแถบขนาด DNA ของตัวอย่างผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียจากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เปรียบเทียบกับแถบขนาด DNA มาตรฐาน 49

13. แสดงผลการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียด้วยวิธี reverse dot blot hybridization 52

14. แสดงแถบขนาด DNA template ที่ใช้ในปฏิกิริยา sequencing 54

15. แสดงโครมาโตแกรมตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์บริเวณ Initiation codon nucleotide ตัวที่ 2 [Ini. nt2 (T-C)] 55

16. แสดงแผ่นไนลอนเมมเบรนสำหรับการกลายพันธุ์ที่ Initiation codon nucleotide ตัวที่ 2 [Ini. nt2 (T-C)] 55

รายการไดอะแกรมประกอบ

รูปที่ **หน้า**

บทที่ 1

1. แสดงลำดับการจัดเรียงตัวของยีนในกลุ่ม α-globin gene cluster และ β-globin gene cluster 4
2. แสดงโครงสร้างของยีนบีตาโกลบิน 8
3. แสดงตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ restriction endonuclease ชนิดต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายในขนาดของท่อน DNA 17

บทที่ 2

4. แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ RDB1, RDB2, RDB3 และ RDB4 บนยีนบีตาโกลบิน และแสดงขนาดของ PCR product 37
5. แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ RDB1, RDB2, G7 และ G10 บนยีนบีตาโกลบิน ขนาดของ PCR product และแสดงตำแหน่ง sequencing primers 42

คำย่อและสัญลักษณ์

°C	=	degree Celcius
DNA	=	deoxyribonucleic acid
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
ddNTP	=	dideoxynucleotide triphosphate
ddATP	=	dideoxyadenosine triphosphate
ddCTP	=	dideoxycytidine triphosphate
ddGTP	=	dideoxyguanosine triphosphate
ddTTP	=	dideoxythymidine triphosphate
EDTA	=	ethylenediamine tetra acetic acid
g	=	gram
mg	=	milligram
µg	=	microgram
ng	=	nanogram
l	=	litre
ml	=	milliliter
µl	=	microlitre
M	=	molar
mM	=	millimolar
pmol	=	picomole
sec	=	second
min	=	minute
hr	=	hour
rpm	=	round per minute

คำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

OD	=	optical density
Hb	=	hemoglobin
Hb A	=	hemoglobin A
Hb E	=	hemoglobin E
IVS	=	intervening sequence
bp	=	base pair
kb	=	kilobase pair
Ini.	=	Initiation
nt	=	nucleotide

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

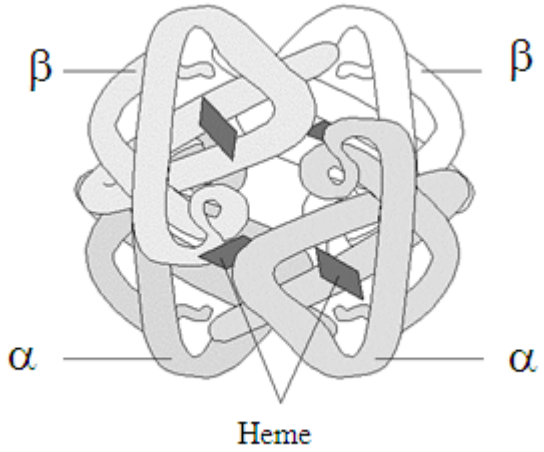
ธาลัสซีเมีย (thalassemia) คือ ภาวะโลหิตจางชนิดหนึ่งเกิดจากเม็ดเลือดแดงผิดปกติมีผลมาจากความผิดปกติของยีนโกลบิน ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโกลบินเปปไทด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้มีการสังเคราะห์สายโกลบินได้น้อยลงหรือสังเคราะห์ไม่ได้เลย ก่อให้เกิดอาการซีดจากเลือดจางเรื้อรัง ตับและม้ามโต การเจริญเติบโตช้า กระดูกขยายใหญ่และเปราะบาง ทำให้รูปหน้าเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า thalassemic faces ซึ่งอาการขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค ธาลัสซีเมียถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive คือ บิดาและมารดาที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย (thalassemia trait, carrier or heterozygote) มีโอกาสมีลูกเป็นโรค (thalassemia diseases or homozygote) ร้อยละ 25 ธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดและเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศแถบเอเชียอาคเนย์ อินเดีย ทะเลจีนใต้ และเมดิเตอร์เรเนียน ในประเทศไทยมีผู้เป็นโรคธาลัสซีเมียประมาณร้อยละ 1 ของประชากร หรือประมาณ 630,000 คน (Panich *et al*., 1992) ในแต่ละปีมีเด็กเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมียเพิ่มขึ้น 13,000 คน และร้อยละ 30-40 ของประชากร หรือประมาณ 18-24 ล้านคน มียีนธาลัสซีเมียชนิดใดชนิดหนึ่งแฝงอยู่ (Panich *et al*., 1992) ธาลัสซีเมียที่สำคัญมี 2 ชนิด คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย และบีตาธาลัสซีเมีย แอลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบิน ซึ่งมี 2 ตำแหน่ง (2 loci) อยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 16 (16p13.3) แอลฟาธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปเป็นท่อนยาวหลายกิโลเบส ส่วนบีตาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติของยีนบีตาโกลบินที่อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 (11p15.5) บีตาธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด มีส่วนน้อยที่เกิดจากการขาดหายไปของยีนขนาดใหญ่ (large deletion)

ปัจจุบันโรคธาลัสซีเมียยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมรักษาให้หายขาดได้ นอกจากวิธีเปลี่ยนถ่ายไขกระดูก โดยทั่วไปผู้ป่วยจะ ได้รับการรักษาโดยการให้เลือด และยาขับเหล็ก การรักษาต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ผู้ป่วยต้องทนทุกข์ทรมาน ตลอดอายุขัย การป้องกันไม่ให้เด็กเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมียจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด ซึ่งได้ทำสำเร็จแล้วหลายประเทศในยุโรป สำหรับประเทศไทยด้วยความร่วมมือของมหาวิทยาลัยต่างๆ มูลนิธิธาลัสซีเมีย และกระทรวงสาธารณสุขได้จัดทำแผนงานธาลัสซีเมียแห่งชาติ 5 ปี ระหว่าง พ.ศ. 2550-2554 เพื่อลดจำนวนเด็กไทยเกิดใหม่ป่วยเป็นโรค

ธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง และให้การดูแลรักษาผู้ป่วยให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น จัดระบบบริการป้องกันควบคุม และรักษาพยาบาลโรคธาลัสซีเมียที่ได้มาตรฐาน ให้บริการตรวจคัดกรองค้นหาคู่สมรสเสี่ยงมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียโดยการตรวจทารกในครรภ์และยุติการตั้งครรภ์หากพบว่าทารกเป็นโรคธาลัสซีเมียที่รุนแรง โดยมีแผนลดจำนวนผู้ป่วยลงร้อยละ 10 ต่อปี คาดว่าภายในระยะเวลา 5 ปี จะสามารถลดผู้ป่วยรายใหม่ชนิดรุนแรงลงร้อยละ 50 หรือลดจำนวนผู้ป่วยรายใหม่ได้ไม่น้อยกว่า 6,500 ราย ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้ไม่น้อยกว่า 32,197 ล้านบาท สำหรับภาคใต้มีโรงพยาบาลสงขลานครินทร์เป็นศูนย์กลางการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ โดยได้มีการศึกษานำร่องแผนดังกล่าวตั้งแต่ปี พ.ศ.2536 และได้ดำเนินการมาตลอดจนถึงปัจจุบัน ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญ คือ รูปแบบและความถี่ชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมีย (Spectrum of β-thalassemia mutation) มีความหลากหลาย และมีความจำเพาะในแต่ละเผ่าพันธุ์ โดยเฉพาะในภาคใต้ที่มีประชากรหลายเชื้อชาติอยู่ร่วมกัน ชนิดการกลายพันธุ์มีความแตกต่างจากภาคอื่นๆ และยังมีอีกหลายชนิดที่ยังตรวจวินิจฉัยไม่ได้ (ประมาณร้อยละ 3) (Nopparatana *et al*., 1995) ทำให้ไม่สามารถให้บริการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ในรายดังกล่าวได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่ยังไม่ทราบชนิดจากตัวอย่างผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ทั้งนี้เพื่อให้สามารถบริการผู้ป่วยได้ครอบคลุมทุกราย

1.2 การตรวจเอกสาร

ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่นำออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อตามอวัยวะต่างๆของร่างกาย และนำคาร์บอนไดออกไซด์จากเนื้อเยื่อไปยังปอด ในแต่ละอณูของฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายโกลบิน (globin chain) 2 ชนิด คือ ชนิดที่อยู่ในกลุ่มแอลฟา (α-globin chain cluster) และชนิดที่อยู่ในกลุ่มบีตา (β-globin chain cluster) ชนิดละ 2 สาย จับอยู่ด้วยกันเป็น 4 สาย (tetramer) ตัวอย่างเช่น ฮีโมโกลบินเอ (Hb A) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินที่พบได้ในผู้ใหญ่ ประมาณร้อยละ 97 ประกอบด้วยสายแอลฟาโกลบิน 2 สาย และสายบีตาโกลบิน 2 สาย มีสูตรโครงสร้าง คือ $\alpha_2\beta_2$ เป็นต้น ซึ่งแต่ละสายจะจับอยู่กับฮีม (heme) 1 โมเลกุล (ภาพที่1)

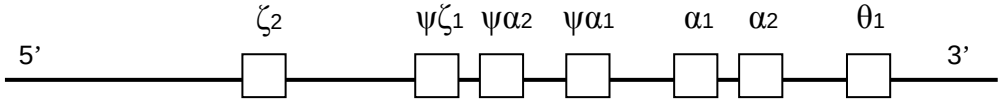


ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของฮีโมโกลบินเอ (Hb A) ประกอบด้วยสายแอลฟาโกลบิน 2 สาย และสายบีตาโกลบิน2สาย ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง คือ $\alpha_2\beta_2$

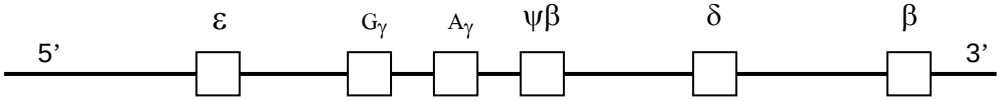
ในคนปกติจะมีการสังเคราะห์สายโกลบินเปปไทด์ 6 สาย คือ alpha globin chain (α-chain), beta globin chain (β-chain), zeta globin chain (ς-chain), gramma globin chain (γ-chain), delta globin chain (δ-chain), epsilon globin (ε-chain) ที่จะประกอบเป็นฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ซึ่งแต่ละชนิดจะมียีนจำเพาะที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบิน โดยจะถูกควบคุมจากยีน 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มยีนแอลฟา (α globin gene cluster) และกลุ่มยีนบีตา (β globin gene cluster) ซึ่งกลุ่มยีนแอลฟา (α globin gene cluster) ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเปปไทด์ชนิด alpha (α) และ zeta (ς) ที่อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 16 (16p13.3) มีขนาดประมาณ 40 kb ประกอบด้วยยีนที่เรียงลำดับจากด้าน 5’ ของสาย DNA ไปยังปลาย 3’ ดังนี้ 5’-ς-ψς-ψα_2-ψα_1-α_2-α_1-θ_1-3’ ยีนซีตา (ς) สังเคราะห์สายโกลบินซีตาที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินในระยะตัวอ่อน (embryonic Hb) ส่วนยีนแอลฟา 2 (α_2) และแอลฟา 1 (α_1) สังเคราะห์สายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอฟ ($\alpha_2\gamma_2$) ของทารกในครรภ์ (Fetal Hb) และของฮีโมโกลบินเอ ($\alpha_2\beta_2$) ในผู้ใหญ่ (Adult Hb) ส่วนกลุ่มยีนบีตาควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเปปไทด์ชนิด beta (β), gramma (γ), delta (δ), epsilon (ε) ที่อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 (11p15.5) มีขนาดประมาณ 50 kb ประกอบด้วยยีนที่เรียงลำดับจากด้าน 5’ ของสาย DNA ไปยังปลาย 3’ ดังนี้ 5’-ε-γ^G-γ^A-ψβ_1-δ-β-3’ (ไดอะแกรมที่ 1) โดยยีนแอปซีลอน (ε) สังเคราะห์สายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินในระยะตัวอ่อน การสังเคราะห์จะค่อยๆลดลง และหยุดสังเคราะห์

เมื่อเข้าสู่ระยะทารก ในขณะเดียวกันยีนแกมมา (γ^G และ γ^A) สร้างสายแกมมาโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอฟ (Hb F) จะค่อยๆสังเคราะห์เพิ่มขึ้นจนเต็มที่ ในขณะที่การสังเคราะห์สายแกมมาโกลบินจะลดลง ยีนบีตา (β) จะสังเคราะห์สายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอในผู้ใหญ่เพิ่มขึ้นจนเต็มที่หลังคลอดประมาณ 1 ขวบ

α-globin gene cluster บน Chromosome 16



β-globin gene cluster บน Chromosome 11



ไดอะแกรมที่ 1 แสดงลำดับการจัดเรียงตัวของยีนในกลุ่ม α-globin gene cluster คือ 5'-ς-ψς-ψα_2-ψα_1-α_2-α_1-θ_1-3' และ β-globin gene cluster คือ 5'-ε-Gγ-Aγ- ψβ-δ-β-3'

เนื่องจากบีตาธาลัสซีเมียเป็นกลุ่มโรคทางพันธุกรรมที่มีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินเปปไทด์ผิดปกติ จึงทำให้เกิดความไม่สมดุลของสายโกลบินเปปไทด์ ทำให้การสร้างเม็ดเลือดแดงไม่มีประสิทธิภาพ มีการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง ความผิดปกติในระดับโมเลกุลที่เป็นสาเหตุของบีตาธาลัสซีเมียเกิดขึ้นได้ในทุกกระบวนการของการทำงานของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเปปไทด์ (ตารางที่ 1) (จินตนา ศิรินาวิน และคณะ, 2544) บีตาธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ที่มีเบสเพียงตัวใดตัวหนึ่งในสายบีตาโกลบินเปลี่ยนแปลงไป หรือเกิดจากการมีเบสเพิ่มขึ้นมามากกว่าปกติในสายบีตาโกลบิน หรือมีการขาดหายไปของเบสตัวเดียวหรือหลายตัว เกิดการกลายพันธุ์ชนิด large deletion ซึ่งการขาดหายไปของเบสนี้มักพบได้น้อยประมาณร้อยละ 7 เท่านั้น บีตาธาลัสซีเมียสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามความสามารถในการสังเคราะห์สายบีตาโกลบิน คือ บีตาบวกธาลัสซีเมีย (β^+-thalassemia) และบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย (β^0-thalassemia) (ปราณี ฟู่เจริญ, 2541)

ตารางที่ 1 กลไกการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดชนิดของบีตาธาลัสซีเมีย และชนิดการกลายพันธุ์ที่พบในคนไทย (ดัดแปลงจาก Fukumaki *et al*., 1992; เพทาย, 2544)

Mechanism	**Mutation**
Promoter mutation	-28 (TAAA-TAGA) -31 (GCAT-GCGT) -86 (CACCC-CACCG) -87 (CACCC-CACAG)
Cap site mutation	+1 (A-C)
Initiation codon mutation	ATG-AGG
Frameshift mutation	codon7 (-GAG) codon8/9 (+G) codon14/15 (+G) codon15 (-T) codon27/28 (+C) codon41 (-C) codon41/42 (-TTCT) codon55 (-A) codon71 (+T) codon71/72 (+A) codon95 (+A) codon123-125 (-ACCCCACC)
Nonsense mutation	codon15 (TGG-TAG) codon17 (AAG-TAG) codon26 (GAG-TAG) codon35 (TAC-TAA) codon43 (GAG-TAG)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Mechanism	Mutation
RNA processing-signal mutation	
- Splice junction mutation	IVS1 nt1 (G<u>T</u>-<u>T</u>T)
- Consensus sequence mutation	IVS1 nt1 (G<u>T</u>-<u>A</u>T)
	IVS1 nt5 (GTTG<u>G</u>-GTTG<u>C</u>)
- Activation of cryptic splice site in intron	IVS2 nt654 (C-T)
- Activation of cryptic splice site in exon	codon30 (A<u>G</u>G-A<u>A</u>G)
	codon19 (A<u>A</u>C-A<u>G</u>C)
	codon26 (<u>G</u>AG-<u>A</u>AG) (Hb E)
	codon126 (G<u>T</u>G-G<u>G</u>G)
Polyadenylation mutation	(AATA<u>A</u>A - AATA<u>G</u>A)
Gene deletion	105 bp deletion
	619 bp deletion
	3485 bp deletion
	12.5 kb deletion
	45 kb deletion
	101 kb deletion
	asian india inversion
	- 0.8 kb deletion ทางด้าน 5’
	- 7.4 kb deletion ทางด้าน 3’

บีตาบวกธาลัสซีเมีย (β^+-thalassemia) ยีนที่ผิดปกติในบีตาธาลัสซีเมียชนิดนี้ยังคงสังเคราะห์สายบีตาโกลบินได้บ้าง แต่มีปริมาณที่น้อยกว่าปกติ จึงยังพบฮีโมโกลบินเอ (Hb A) ได้ แต่บางชนิดมีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินได้น้อยมาก ทำให้ตรวจไม่พบฮีโมโกลบินเอจากการกลายพันธุ์ชนิดนั้น กลไกการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่เป็นสาเหตุของบีตาบวกธาลัสซีเมีย เกิดขึ้นที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ควบคุมการทำงานของยีน หรือที่ควบคุมกระบวนการ RNA processing หรือทำให้กระบวนการนี้ผิดปกติ ส่วนต่างๆของยีนที่เกิดการกลายพันธุ์ (ไดอะแกรมที่ 2) คือ

- บริเวณ promoter ซึ่งอยู่ทางด้าน 5' ของยีน มี 3 ตำแหน่ง ได้แก่ TATA box ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งประมาณ -20 ถึง -30 bp ห่างจาก cap site ไปทาง upstream, proximal CACACCC elements ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งประมาณ -80 ถึง -96 bp และ distal CACACCC elements ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งประมาณ -100 ถึง -110 bp การเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งเหล่านี้ทำให้การสังเคราะห์ mRNA จากยีนลดลง จึงมีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินลดลง

- ที่ cap site ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเริ่มต้นของการสังเคราะห์ mRNA การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ทำให้การสังเคราะห์ mRNA ลดลงจากกระบวนการ capping เกิดไม่สมบูรณ์เป็นผลให้ mRNA ไม่มีเสถียรภาพ

- บริเวณ consensus sequence ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ข้าง 5' donor (GT) splice site (ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่าง exon กับ intron) และที่อยู่ข้าง 3' acceptor (AG) splice site (ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่าง intron กับ exon) ของยีน การกลายพันธุ์ในบริเวณนี้ทำให้เกิดการ splicing ที่ผิดปกติ

- บริเวณ cryptic splice site ได้แก่ splice site ที่ซ่อนอยู่ใน exon และ intron ของยีน การกลายพันธุ์ในบริเวณนี้จะทำให้เกิด activation และมีการใช้ cryptic splice site ที่ผิดปกติทำให้เกิดการตัดต่อ exon และ intron ผิดที่

- บริเวณ RNA cleavage และ polyadenylation signal ซึ่งอยู่ทางด้านปลาย 3' ของยีน การกลายพันธุ์ในบริเวณนี้จะทำให้ mRNA มีเสถียรภาพน้อยลง

บีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย (β^0-thalassemia) ยีนที่ผิดปกติในบีตาธาลัสซีเมียชนิดนี้ ไม่มีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินเลย การกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่เป็นสาเหตุของบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย เกิดใน 3 บริเวณ (ไดอะแกรมที่ 2) คือ

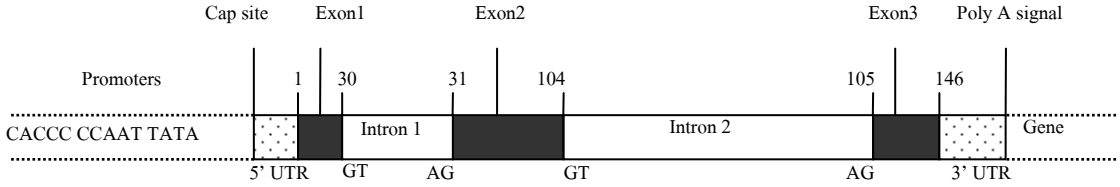
- บริเวณ exon การกลายพันธุ์ใน exon ทำให้รหัส (codon) เปลี่ยนแปลงไปและเกิด mRNA ที่ไม่สามารถใช้ในการสังเคราะห์สายบีตาโกลบิน ลักษณะของการกลายพันธุ์มี 2 แบบ คือ nonsense mutation และ frameshife mutation แบบแรกเป็นการแทนที่นิวคลีโอไทด์ ทำให้ codon ที่เป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโนเปลี่ยนไปเป็นรหัสหยุด และไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนต่อไปได้ แบบที่สอง

เกิดจากการสอดแทรกเข้ามาหรือการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ในจำนวนที่ไม่ครบสาม ทำให้มีความคลาดเคลื่อนในการอ่านชุดรหัสสำหรับกรดอะมิโนหรือเกิดรหัสหยุดขึ้น

- บริเวณ splice junction ตามปกติตรงรอยต่อระหว่าง exon กับ intron และระหว่าง intron กับ exon ของยีน มีนิวคลีโอไทด์ที่เรียงกันสองนิวคลีโอไทด์ คือ GT ที่ 5' donor splice site และ AG ที่ 3' acceptor splice site (ไดอะแกรมที่ 2) ถ้ามีการกลายพันธุ์ที่ทำให้นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวเปลี่ยนแปลง จะทำให้ splicing เกิดขึ้นไม่ได้ตามปกติ และได้ mRNA ที่ผิดปกติ

- ที่ initiation codon ซึ่งเป็น codon สำหรับกรดอะมิโน methionine และเป็นรหัสแรกในการสังเคราะห์สายบีตาโกลบิน

- gene deletion การกลายพันธุ์ทำให้การขาดหายไปของยีนบางส่วนหรือขาดหายไปทั้งหมด ยีนจึงทำหน้าที่ไม่ได้



ไดอะแกรมที่ 2 แสดงโครงสร้างของยีนบีตาโกลบินประกอบด้วย exon จำนวน 3 exon (exon เป็น coding region ของยีน) และ intron หรือ intervening sequence แทรกอยู่ระหว่าง exon ทั้งสามทางด้าน 5' และ 3' ของยีนมีส่วน untranslated sequence และห่างออกไปทาง 5' มี promoter sequence (ตัวเลขที่อยู่ข้างบนของยีนแสดงตำแหน่ง codon ของ coding sequence)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างบีตาศูนย์ธาลัสซีเมียกับบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย ($\beta^{\circ}/\beta^{\circ}$) บีตาศูนย์ธาลัสซีเมียกับบีตาบวกธาลัสซีเมีย (β°/β^{+}) หรือบีตาบวกธาลัสซีเมียกับบีตาบวกธาลัสซีเมีย (β^{+}/β^{+}) ทำให้เกิดบีตาธาลัสซีเมียได้หลายชนิด และมีอาการรุนแรงได้มากน้อยแตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลักษณะความผิดปกติของการสังเคราะห์สายโกลบินในกลุ่มที่เป็นโรคและพาหะบีตาธาลัสซีเมียที่พบในคนไทย (ปราณี ฟู่เจริญ, 2541)

Phenotype	Genotype	ลักษณะความผิดปกติ
β^0-thalassemia heterozygote	β^0/β	ไม่มีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินจากโครโมโซมข้างที่ผิดปกติ
β^+-thalassemia heterozygote	β^+/β	มีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินจากโครโมโซมข้างที่ผิดปกติบ้าง แต่ในปริมาณที่ลดลงกว่าเดิม
Hb E heterozygote	β^E/β	ความผิดปกติเกิดที่ codon 26 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Glu-Lys ข้างที่ผิดปกติสร้างสายบีตาโกลบินลดลง
homozygous Hb E	β^E/β^E	มีการสังเคราะห์สาย β^E-globin จากโครโมโซมทั้งสองข้างในปริมาณที่ลดลง แต่ไม่มีอาการของโรคบีตาธาลัสซีเมีย
β^0-thalassemia/Hb E	β^0/β^E	มีการสังเคราะห์สาย β^E-globin บนโครโมโซมเพียงข้างเดียว แต่ปริมาณลดลง (อาการรุนแรงปานกลางถึงรุนแรงค่อนข้างมาก)
β^+-thalassemia/Hb E	β^+/β^E	มีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินปกติจากโครโมโซมข้างที่เป็น β^+-thalassemia ได้บ้าง (อาการรุนแรงน้อยกว่าโรค β^0-thalassemia/Hb E)
β^0-thalassemia /β^+-thalassemia	β^0/β^+	มีการสร้างสายบีตาโกลบินปกติเพียงเล็กน้อย อาจมีอาการซีดที่รุนแรงมาก (thalassemia major) หรือปานกลาง (thalassemia intermedia) ก็ได้
homozygous β^+-thalassemia	β^+/β^+	มีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินได้บ้าง มีอาการซีดปานกลาง (thalassemia intermedia)
homozygous β^0-thalassemia	β^0/β^0	ไม่มีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินเลย มีอาการซีดรุนแรงมาก (thalassemia major) มักเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อย

บีตาธาลัสซีเมียมีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย โดยพบอุบัติการณ์ของประชากรไทยที่มียีนพาหะของบีตาธาลัสซีเมียร้อยละ 3-9 และคาดว่าในแต่ละปีจะมีเด็กทารกเกิดใหม่ที่เป็นโรคบีตาธาลัสซีเมียประมาณ 3,875 คน เมื่อคำนวณจากเด็ก 1 ล้านคนต่อปี ซึ่งในแต่ละภูมิภาคจะพบความถี่ของชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียที่ไม่เท่ากัน (Sirichotiyakul *et al*., 2003) อาจเนื่องมาจากการได้รับอิทธิพลของอัลลีลจากประเทศใกล้เคียง เพราะชนิดการกลายพันธุ์จะจำเพาะในแต่ละกลุ่มประชากร ปัจจุบันมีรายงานการพบการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดบีตาธาลัสซีเมียในประชากรต่างๆทั่วโลกกว่า 200 ชนิด การกลายพันธุ์ที่พบในประชากรไทยส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเช่นเดียวกันกับประชากรอื่น สำหรับการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการขาดหายไปของยีนพบอย่างน้อยสามชนิด คือ 105, 619 และ 3485 bp ทั้งสามชนิดทำให้เกิดบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย ส่วนการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่พบในประชากรไทยมีรายงานแล้วกว่า 30 ชนิด (Vathana *et al*., 2005) ประมาณ 8 ชนิด ทำให้เกิดบีตาบวกธาลัสซีเมีย ส่วนอีก 17 ชนิด ทำให้เกิดบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย บางชนิดยังไม่ทราบแน่ชัด การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดบีตาบวกธาลัสซีเมียที่พบบ่อยที่สุดในประชากรไทย คือ การกลายพันธุ์ที่ TATA box ซึ่งเกิดจากมีนิวคลีโอไทด์แทนที่ที่ตำแหน่ง -28 (A-G) แต่ในภาคใต้มีการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดบีตาบวกธาลัสซีเมียแตกต่างจากภาคอื่น คือ มีการกลายพันธุ์ที่พบค่อนข้างบ่อยอีกชนิด คือ การกลายพันธุ์ที่ IVS1 nt5 ที่เกิดจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (G-C) ซึ่งพบบ่อยในประชากรอินเดีย ปากีสถาน พม่า มาเลเซีย อินโดนีเซีย และปาปัวนิวกินี (Laosombat *et al*., 1992) ส่วนการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดบีตาศูนย์ธาลัสซีเมียที่บ่อยที่สุด คือ การกลายพันธุ์ที่ codon41/42 เกิดจากมี 4 นิวคลีโอไทด์ขาดหายไป (-TCTT) ซึ่งมีรายงานที่ตรงกันกับประชากรของประเทศจีนและประเทศเวียดนามใต้ (Thein *et al*., 1990; Svasti *et al*., 2002), การกลายพันธุ์ที่ codon17 (A-T) และ IVS2 nt654 (C-T) (Winichagoon *et al*., 1999) นอกจากนี้ยังมีอีก 4 ชนิด ที่พบได้บ่อยในประชากรไทยที่ทำให้เกิดบีตาบวกธาลัสซีเมียและบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย คือ IVS1 nt1 (G-T), codon35 (C-A) และ codon71/72 (+A) ทั้ง 8 ชนิด ที่กล่าวข้างต้นไม่นับรวมชนิดที่ทำให้เกิดฮีโมโกลบินผิดปกติ (Hb E และ Hb Malay) ซึ่งเป็นชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประชากรไทย (common β-thalassemia) มีบีตาธาลัสซีเมียบางชนิดพบได้ แต่พบได้น้อยในประชากรไทยรวมทั้งประเทศใกล้เคียงจัดว่าเป็น uncommon β-thalassemia และยังมีบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิดการกลายพันธุ์อีกประมาณร้อยละ 3 (Nopparatana *et al*., 1995) (ตารางที่ 3) และยังมีบางชนิดที่เพิ่งเคยมีรายงานเพิ่มเติมในประเทศไทย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ความถี่ของชนิดการกลายพันธุ์บีตาธาลัสซีเมียที่พบในประชากรไทย เปรียบเทียบแต่ละภูมิภาค (ปราณี ฟู่เจริญ และสุทัศน์ ฟู่เจริญ, 2541)

Mutations	Frequency (%)				Type
	South	Central	North	Northeast	
codon41/42 (-TCTT)	30.1	41.6	39.8	37.7	common mutation
IVS1 nt5 (G-C)	18.8	4.3	2.8	0	common mutation
codon19 (AAC-AGC)	15.2	2.9	ND	0	common mutation
codon17 (AAG-TAG)	11.3	16.5	39.8	29.5	common mutation
IVS1 nt1 (G-T)	6.0	1.3	ND	1.6	common mutation
-28 (A-G)	5.7	9.3	3.5	1.6	common mutation
3.5 kb deletion	4.3	1.1	ND	ND	common mutation
IVS2 nt654 (C-T)	2.1	8.0	1.4	9.8	common mutation
codon71/72 (+A)	0	2.1	0	13.1	common mutation
codon41 (-C)	1.4	0.8	ND	0	uncommon mutation
codon8/9 (AGTCT-AGGTCT)	0.4	0	0	0	uncommon mutation
105 bp deletion	0.4	0	0	0	uncommon mutation
codon15 (TGG-TAG)	0.4	0	0	0	uncommon mutation
cap site +1 (A-C)	0.4	0	0	0	uncommon mutation
IVS1 nt1 (G-A)	0.4	0	0	0	uncommon mutation
-88 (C-T)	0	0	0	0	uncommon mutation
-86 (C-G)	0	0.5	0	0	uncommon mutation
codon16 (-C)	0	0	0	0	uncommon mutation
codon35 (C-A)	0	2.7	0	0	uncommon mutation
codon26 (G-T)	0	ND	0	1.6	uncommon mutation

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Mutations	Frequency (%)				Type
	South	Central	North	Northeast	
619 bp deletion	0	1.1	0	0	uncommon mutation
codon43 (G-T)	0	0.8	0	0	uncommon mutation
codon15 (-T)	0	0.3	0	0	uncommon mutation
codon14/15 (+G)	0	0.3	0	0	uncommon mutation
uncharacterized	3.1	6.4	13.3	4.9	
Total allele	282	375	113	61	

ตารางที่ 4 แสดง uncommon β-thalassemia mutation ที่เคยมีรายงานเพิ่มเติมในประเทศไทย

Mutations	Frequency (%)			
	South	Central	North	Northeast
-31 (A-G)	ND	9 cases	1 case	ND
Ini. nt2 (T-G)	ND	3 cases	ND	ND
IVS1 nt1 (G-A)	0.4	0	0	0
codon14/15 (+G)	0	0.3	0	0
codon35 (C-A)	0	2.7	0	0
cap site+1 (A-C)	0.4	2 cases	0	0
codon15 (-T)	2 cases	0.3	0	0

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าบีตาธาลัสซีเมียมีความหลากหลายของชนิดการกลายพันธุ์มาก และจากการศึกษาค้นคว้านับจากอดีตจนถึงปัจจุบันพบว่าทั่วโลกได้ให้ความสนใจศึกษาวิจัย ค้นคว้าเกี่ยวกับกลไกการเกิดการกลายพันธุ์และชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียเป็นอย่างมาก ทำให้ค้นพบชนิดการกลายพันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้นดังตารางที่ 4 ข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญสำหรับการวางแผนควบคุมและป้องกันธาลัสซีเมีย เนื่องจากการควบคุมและป้องกันธาลัสซีเมียจำเป็นต้องอาศัยวิธีการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ซึ่งวิธีนี้จำเป็นต้องทราบชนิดการกลายพันธุ์ของพ่อและแม่ก่อน จึงจะตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ได้ถูกต้อง และการศึกษาเพื่อทราบชนิดการกลายพันธุ์จะช่วยบอกความรุนแรงและลักษณะทางคลินิกของโรคนี้ได้บางส่วน การตรวจสอบบีตาธาลัสซีเมียการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ในอดีตใช้เทคนิค dot blot hybridization ซึ่งสามารถตรวจสอบได้เพียงครั้งละหนึ่งชนิดเท่านั้น ทำให้เสียเวลาในการตรวจและค่าใช่จ่ายสูง จึงมีการพัฒนาเทคนิค Reverse dot blot hybridization ขึ้น ซึ่งวิธีนี้ทำให้ตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ได้หลายชนิดในการทดสอบเพียงครั้งเดียว เป็นวิธีที่รวดเร็วเหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ที่เสี่ยงต่อโรคบีตาธาลัสซีเมีย (Winichagoon *et al*., 1999) สำหรับวิธีการตรวจชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิด นิยมใช้เทคนิค direct DNA sequencing เนื่องจาก β-globin gene เป็นยีนที่มีขนาดเล็กการทำ DNA sequencing จึงทำได้ค่อนข้างสะดวก เช่น ในปี ค.ศ.1992 ได้มีการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิดจากผู้ที่เป็น β-thalassemia/Hb E ด้วยวิธี direct sequencing ทำให้พบการกลายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีรายงานในคนไทยมาก่อน คือ codon95 (+A) (Fukumaki *et al*., 1992) ซึ่งการกลายพันธุ์บริเวณนี้ทำให้มีความคลาดเคลื่อนในการอ่านชุดรหัสสำหรับกรดอะมิโนและมีการเกิดรหัสหยุดขึ้นที่ codon101 จำนวน 1 ราย ปี ค.ศ.1995 ได้มีการใช้วิธี dot blot hybridization, specific PCR-amplification และ direct DNA sequencing ตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียในคนภาคใต้ พบบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดทั้งหมด 12 ชนิด และบีตาธาลัสซีเมียชนิดการขาดหายไปของเบส 2 ชนิด ซึ่งการพบชนิดการกลายพันธุ์ทั้งหมดนี้ เป็นชนิดที่สามารถพบได้บ่อยของทางภาคใต้ 7 ชนิด คือ codon41/42 (-TCTT), IVS1 nt5 (G-C), codon19 (AAC-AGC), codon17 (AAG-TAG), IVS1 nt1 (G-T), -28 (A-G) และการขาดหายไปของเบส 3.5 kb นอกจากนี้ได้มีการพบการกลายพันธุ์ที่บริเวณ cap site +1 (A-C) ในภาคใต้ และ IVS1 nt1 (G-A) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย โดยใช้วิธี direct DNA sequencing (Nopparatana *et al*., 1995; Sriroongrueng *et al*., 1997) และในปี ค.ศ.2002 ได้มีการพบการกลายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน คือ -87 (C-A), -31 (A-G) (Charoenkwan, 2002), Ini. nt2 (T-G), codon55 (-A) และ codon7 (-GAG) โดยใช้วิธี automated fluorescence DNA sequencing technique ได้ในผู้ป่วยเด็ก β-thalassemia major (ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี และคณะ, 2546) เป็นต้น

ความรู้ในเรื่องอณูชีววิทยาและการพัฒนาเทคนิคต่างๆทางด้านอณูชีววิทยา ทำให้มีความรู้ความเข้าใจถึงสาเหตุของการเกิดบีตาธาลัสซีเมีย และทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้ โดยอาศัยวิธีการทางอณูชีววิทยา (Molecular diagnosis) ซึ่งมีอยู่หลายวิธี ดังต่อไปนี้

การตรวจหาความผิดปกติระดับยีนของบีตาธาลัสซีเมีย
(Molecular Diagnosis of β-thalassemia)

1. วิธีตรวจชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดของบีตาธาลัสซีเมียที่ไม่ทราบชนิด (unknown mutation) ทำได้โดย screen ส่วนของยีนหรือ DNA ที่คาดว่าผิดปกติ แล้วจึงตรวจหาชนิดของเบสที่ผิดปกตินั้น โดยการตรวจหาลำดับเบสของ DNA ต่อไป วิธีการ “screen” หาส่วนของยีนที่ผิดปกติที่นิยมกันได้แก่

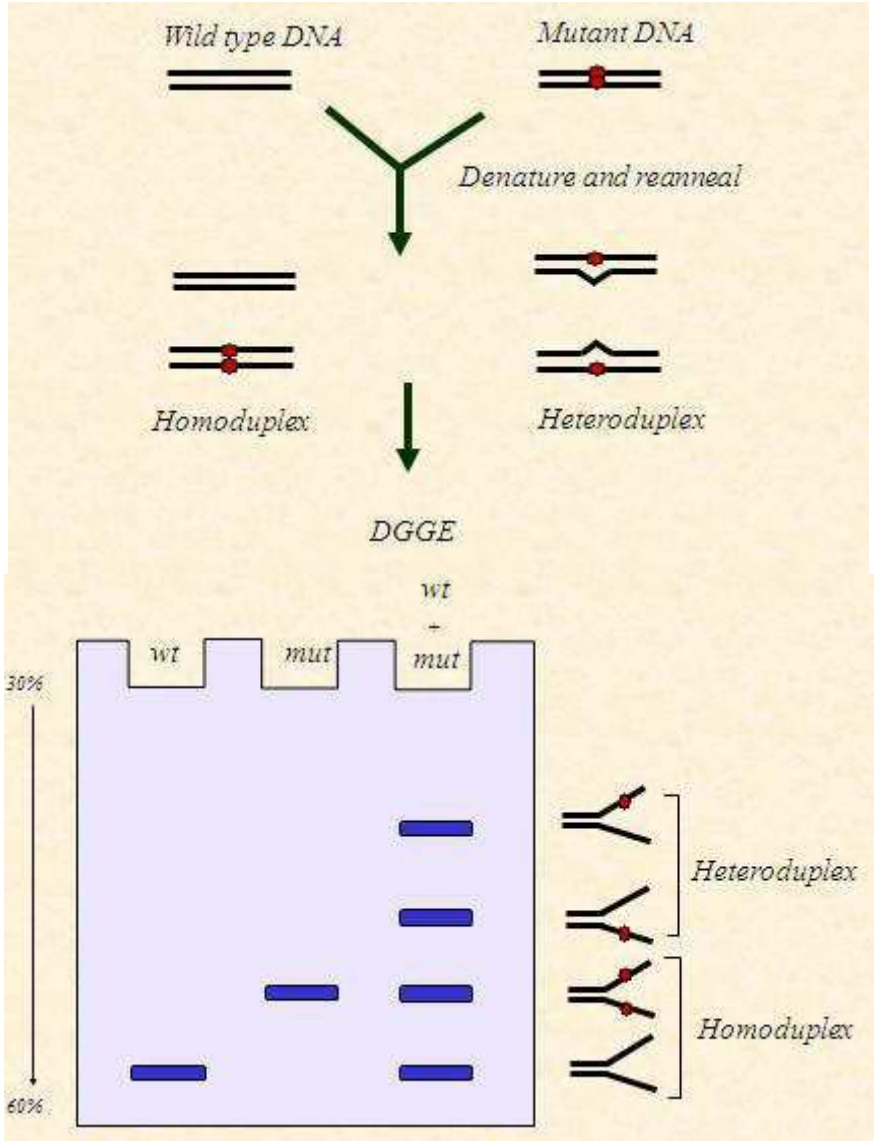
1.1 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) อาศัยหลักการ คือ การนำ PCR product มาแยกด้วย polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งมี denaturant เป็น urea กับ formamide ที่เพิ่มความเข้มข้นจากน้อยไปมาก PCR product ที่ได้จาก DNA จะประกอบไปด้วย

- DNA สายคู่ที่เป็น homoduplex คือ DNA ที่จับคู่กันนั้น complementary กัน อาจจะเป็น normal sequence ทั้งสองเส้นหรือเป็น mutant sequence ทั้งสองเส้น

- DNA สายคู่ที่เป็น heteroduplex ซึ่ง DNA ที่จับคู่กันจะเป็น mismatched DNA duplex

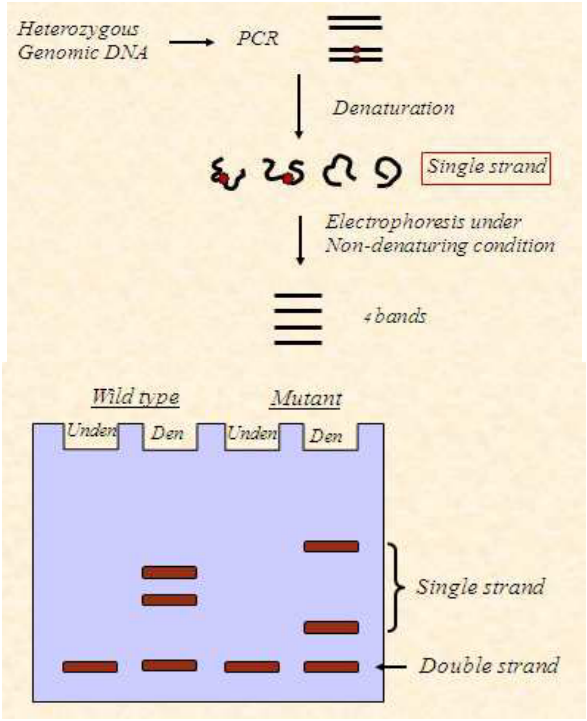
เมื่อ PCR product ซึ่งเป็น DNA สายคู่ ที่มี melting temperature (Tm) ต่างกัน เคลื่อนที่ไปใน polyacrylamide gel ที่มี denaturant ดังกล่าว ในตอนแรกอัตราการวิ่งของ DNA ใน gel จะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล แต่เมื่อถึงจุดที่เป็น Tm ของ DNA เส้นนั้น การเคลื่อนที่ของ DNA จะช้าลง เพราะ DNA เริ่มคลายเกลียวออกเป็นเส้นเดี่ยว ทำให้ DNA ที่มีเบสต่างกันเพียง 1 ตัวก็จะเคลื่อนที่ได้ต่างกัน เพราะ Tm ต่างกัน และโมเลกุลของ heteroduplex DNA จะมีเสถียรภาพน้อยกว่า homoduplex DNA จึง denature ได้ง่าย เมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า Tm หรืออยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของ denaturing compound เช่น formamide ที่ต่ำกว่า ดังนั้นเมื่อทำ electrophoresis DNA ที่เป็น heteroduplex จะ denature ก่อน และเกิดเป็นสาย DNA ที่มีลักษณะเป็นรูปส้อม หรือ Y-shaped strand ซึ่งจะเคลื่อนที่ในวุ้นได้ช้า DNA ที่มีลักษณะ Y-shaped นี้เกิดได้ดีเมื่อ PCR primer มีส่วนของ GC rich sequence (GC-clamp) อยู่ทางด้านปลาย 5’ ของ primer ข้างหนึ่ง DNA ส่วนที่เป็น

GC rich จะยังคงพันเกลียวกันแน่น ในขณะที่ DNA ส่วนที่เป็น heteroduplex จะคลายเกลียวออกจากกัน จึงเห็น DNA มีลักษณะเป็น Y-shaped (ภาพที่ 2)



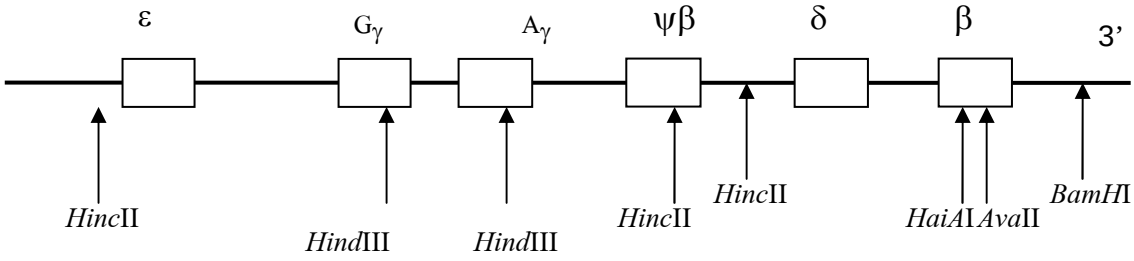
ภาพที่ 2 แสดง Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) DNA สายคู่ที่เป็น homoduplex และ DNA สายคู่ที่เป็น heteroduplex ที่มี melting temperature (Tm) ต่างกัน เคลื่อนที่ไปใน polyacrylamide gel ทำให้ DNA ที่มีเบสต่างกันเพียง 1 ตัวเคลื่อนที่ได้ต่างกัน โมเลกุลของ heteroduplex DNA จะมีเสถียรภาพน้อยกว่า homoduplex DNA จึง denature ได้ง่าย เมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า Tm ดังนั้นเมื่อทำ electrophoresis ใน formamide gradient gel DNA ที่เป็น heteroduplex จะ denature ออกมาก่อน Wt: wild-type DNA ; Mut: mutant DNA

1.2 Single-stranded conformation polymorphism (SSCP) อาศัยหลักการ คือ เมื่อ denature DNA ที่ได้จากการทำ PCR จนกระทั่ง DNA ที่เป็นสายคู่สองสาย (double strand DNA) แยกออกจากกันเป็น DNA สายเดี่ยว (single strand DNA) DNA สายเดี่ยวนั้นจะเกิดการเปลี่ยนรูปร่างขดม้วนและพับไปมา (folded conformation) ตามชนิดของเบสในสาย DNA เรียกว่า single strand conformation polymorphism (SSCP) ดังนั้นถ้า DNA สายนั้นมีเบสแตกต่างกันแม้เพียงชนิดเดียวก็จะทำให้ conformation ของ DNA เส้นนั้นแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลของ DNA นั้น ใน non-denaturing polyacrylamide electrophoresis แตกต่างกันด้วย จึงใช้เป็นวิธีการตรวจ DNA ที่เกิด point mutation หรือ DNA ที่มีเบสเปลี่ยนแปลงไปจากการเกิด polymorphism ความไวของเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ionic strength ของ buffer pore size ของ gel และความเข้มข้นของ glycerol ในการทำ electrophoresis และยังขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR (ภาพที่ 3)

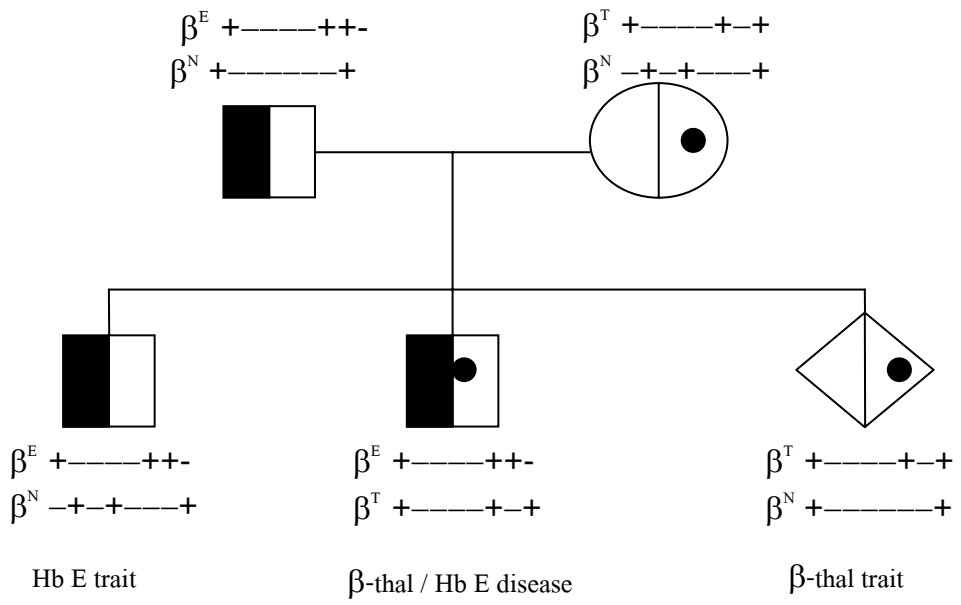


ภาพที่ 3 แสดง Single-stranded conformation polymorphism (SSCP) DNA สายคู่ที่ denature แล้วแยกออกเป็น DNA สายเดี่ยว DNA สายเดี่ยวนั้นเกิดการเปลี่ยนรูปร่างขดม้วนและพับไปมา (folded conformation) ตามชนิดของเบสในสาย DNA เรียกว่า single strand conformation polymorphism (SSCP) ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุล DNA ใน non-denaturing polyacrylamide electrophoresis แตกต่างกัน Un: un-denature; Den: Denature

1.3 Linkage Analysis วิธีนี้เป็นการตรวจหาความผิดปกติของยีนทางอ้อม (indirect mutation detection) ใช้สำหรับตรวจชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาโกลบินยีนที่ไม่ทราบชนิด หรือเป็นชนิดที่ไม่รู้จักมาก่อน (unknown mutation) หรือในกรณีที่ต้องการทราบเพียงว่าเด็กในครรภ์ได้รับยีนผิดปกติหรือไม่ โดยไม่ต้องการทราบชนิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene cluster) มีตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์เรียงตัวต่างกันในกลุ่มประชากร ที่เรียกว่า DNA polymorphism ทำให้เกิดตำแหน่งตัดด้วย restriction endonuclease ชนิดใดชนิดหนึ่งที่จำเพาะแตกต่างกันไป (ไดอะแกรมที่ 3) และเกิดท่อน DNA ขนาดแตกต่างกัน ที่เรียกว่า Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ตัวอย่างเช่น เอ็นไซม์ *Hinc*II มีตำแหน่งตัด 3 ตำแหน่ง คือ ที่ 5' ของยีน ε, ในยีน ψβ และระหว่างยีน ψβ กับยีน δ เอ็นไซม์ *Hind*III มีตำแหน่งตัด 2 ตำแหน่ง คือ ในยีน γ^G และ γ^A เอ็นไซม์ *HaiA*I และ *Ava*II มีตำแหน่งตัดในยีนบีตาโกลบิน เอ็นไซม์ *BamH*I มีตำแหน่งตัดทางด้าน 3' ของยีนบีตาโกลบิน สามารถใช้ RFLP ที่เกิดจากความผันแปรในตำแหน่งตัดของ restriction endonuclease เหล่านี้เป็น genetic marker ติดตามการถ่ายทอดอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์และอัลลีลปกติของยีนบีตาโกลบินในครอบครัวได้ ถ้าใช้หลาย RFLP marker หลายชนิดร่วมกันเป็นชุด ที่เรียกว่า haplotype ในการวิเคราะห์ (haplotype analysis) จะช่วยให้ผลการตรวจแม่นยำขึ้น วิธีวิเคราะห์ linkage นี้ใช้ได้กับครอบครัวที่มีลูกเป็นโรคแล้ว (retrospective diagnosis) และจำเป็นต้องทำการตรวจทั้งครอบครัว เพื่อให้ทราบก่อนว่าในครอบครัวนั้นอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินจากพ่อถ่ายทอดไปกับ RFLP marker ใด และจากแม่ถ่ายทอดไปกับ RFLP marker ใด เมื่อติดตามการถ่ายทอดของ RFLP marker เหล่านั้นในครอบครัว ทำให้ทราบว่าสมาชิกครอบครัวคนใดได้รับถ่ายทอดยีนผิดปกติไปหรือไม่ และเป็นโรคบีตาธาลัสซีเมียหรือไม่ (ภาพที่ 4)



ไดอะแกรมที่ 3 แสดงตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ restriction endonuclease ชนิดต่างๆซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายในขนาดของท่อน DNA (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) และใช้เป็น DNA marker สำหรับติดตามการถ่ายทอดยีนบีตาโกลบินที่ผิดปกติในครอบครัว



ระบายทึบ = ยีน Hb E (β^E)

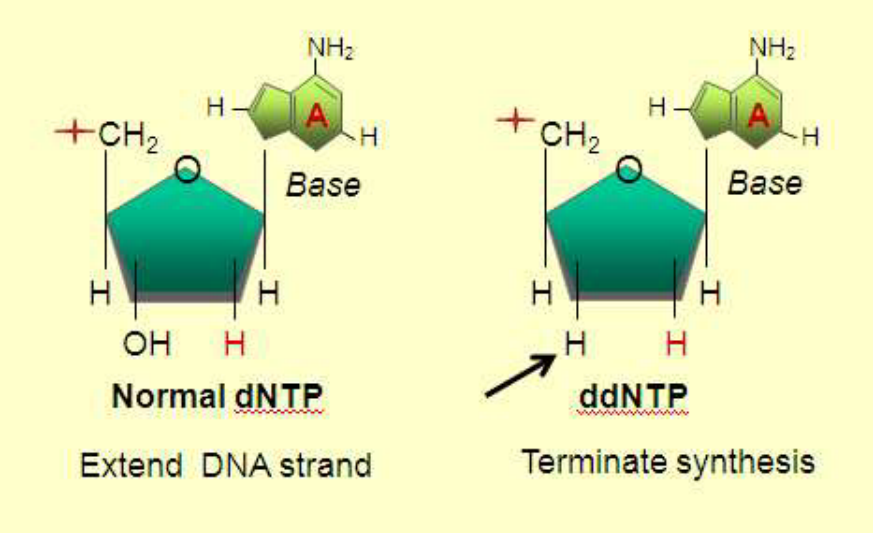
จุดกลม = ยีน β-thalassemia (β^T)

ภาพที่ 4 แสดงการติดตามการถ่ายทอดยีนบีตาโกลบินที่ผิดปกติในครอบครัวที่มีลูกเป็น β-thalassemia / Hb E disease โดยการวิเคราะห์ RFLP haplotype ในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน ในภาพยีน Hb E (β^E) ของพ่อถ่ายทอดไปกับ haplotype +–––––++- และยีน β-thalassemia (β^T) ของแม่ถ่ายทอดไปกับ haplotype +–––––+–+, ลูกคนที่ 3 ที่อยู่ในครรภ์ได้รับ haplotype +–––––+–+ จากแม่ และได้รับ haplotype +–––––––+ ของยีนปกติ (β^N) จากพ่อ จึงทำนายได้ว่าลูกในครรภ์เป็น β-thalassemia trait

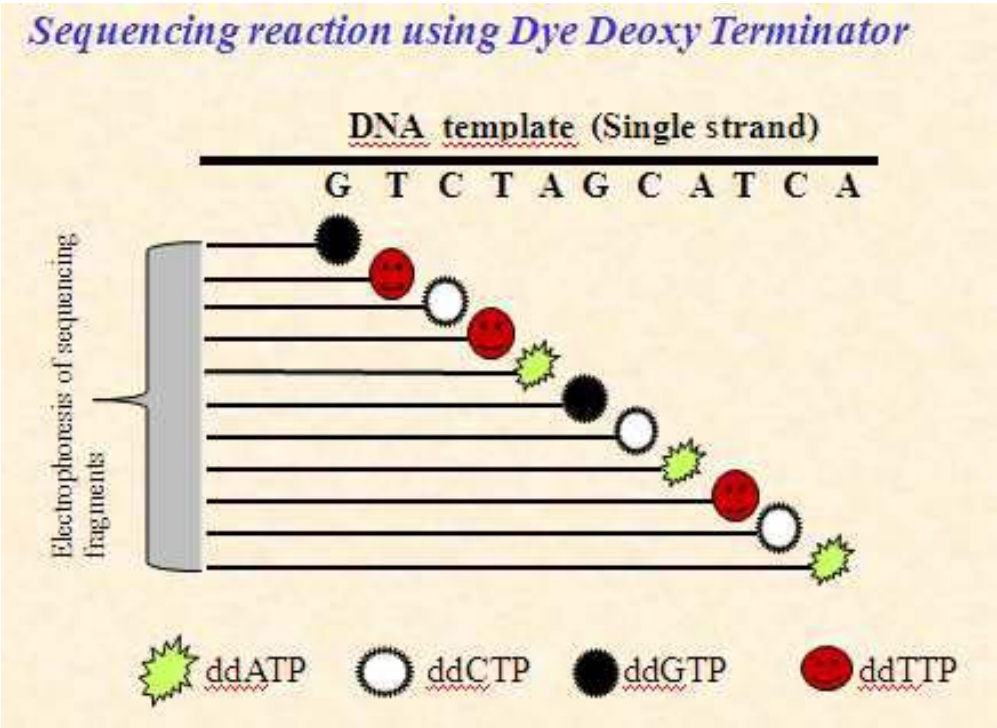
1.4 Mismatch Analysis หลักการ คือ mismatched DNA duplex ที่ได้จาก PCR product ของ DNA ที่มี heterozygous alleles จะมี mismatched base ที่ถูกตัด (cleave) ได้ด้วยเอ็นไซม์ endonuclease หรือถ้า mismatched base นั้นเป็น C หรือ T จะทำปฏิกิริยากับ hydroxylamine และ osmium tetroxide DNA สายเดี่ยวที่มี unpaired หรือ modified base ดังกล่าวจะถูกย่อยด้วยสารเคมี piperidine กลายเป็น DNA ชิ้นย่อยๆ ซึ่งตรวจสอบได้โดยการทำ electrophoresis ข้อเสียของวิธีนี้ คือ สารเคมีที่ใช้เป็นสารมีพิษ มีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก และความจำเพาะต่ำ

การตรวจวิเคราะห์เพื่อหาตำแหน่งและชนิดการกลายพันธุ์

DNA sequencing วิธีนี้เหมาะสำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดทุกชนิดทั้งที่ทราบชนิด (known mutation) และไม่ทราบชนิด (unknown mutation) การหาลำดับเบสของ DNA อาจทำได้โดยวิธีการทางเคมี (Maxam and Gilbert method) แต่วิธีที่นิยมใช้เป็นวิธีการทางเอ็นไซม์ เรียกว่าวิธี dideoxy terminator method หรือ chain termination ซึ่งค้นพบโดย Sanger และคณะ การตรวจหาลำดับเบสด้วยวิธีนี้อาจทำได้ 2 แบบ คือ เตรียมจาก recombinant DNA ซึ่งเป็นการสอดใส่ DNA ที่ต้องการตรวจหาลำดับเบสเข้าไปใน vector ซึ่งอาจเป็น plasmid, bacteriophage หรือ cosmid เพิ่มจำนวนของ DNA ที่ต้องการศึกษาโดยการ subclone แล้วจึงหาลำดับเบส หรือเตรียมจาก DNA ที่ได้จากการทำ PCR หลักการของวิธี Sanger และคณะ คือ การเอา oligonucleotide primer (sequencing primer) เข้าไปจับกับส่วนของ DNA template ที่ต้องการศึกษาลำดับเบส เมื่อเติมเอ็นไซม์ DNA polymerase จะทำให้เกิดการสร้าง oligonucleotide fragment ที่ complementary กับ DNA template จากการเติม dideoxynucleotide (ddNTP) ซึ่งเป็น analog ของ dNTP อยู่ด้วย การสร้าง oligonucleotide เส้นใหม่นี้จะหยุดลงเมื่อ ddNTP เข้าไปจับที่ปลาย 3’ ทั้งนี้เพราะ ddNTP ไม่มี OH group ที่จะทำให้ nucleotide ตัวใหม่เข้าไปต่อได้ (ภาพที่ 5) oligonucleotide หรือ DNA สายใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นจะมีขนาดแตกต่างกันแล้วแต่ตำแหน่งและชนิดของ ddNTP ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ตัว คือ ddATP หรือ ddGTP หรือ ddCTP หรือ ddTTP ที่เข้าไปแย่งจับในปฏิกิริยา เมื่อนำปฏิกิริยาที่ได้ไปทำ electrophoresis บนแผ่น gel ที่มีความละเอียดสูง (polyacrylamide gel electrophoresis) ท่อน DNA เหล่านี้จะแยกออกจากกันและเรียงตามขนาดความยาว โดย DNA แต่ละสายจะมีเบสตัวสุดท้ายตรงกับชนิดของ dideoxy nucleotide ที่ใช้ในปฏิกิริยา ทำให้สามารถอ่านลำดับของเบสได้ (ภาพที่ 6) ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาให้สามารถใช้ร่วมกับเครื่องมืออัตโนมัติ (automated DNA sequencing) ทำให้การอ่านผลและวิเคราะห์ผลทำได้สะดวกมากขึ้น ทั้งยังลดปริมาณสารเคมีได้มาก และไม่จำเป็นต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีอีกต่อไป แต่ข้อเสีย คือ เครื่องมือและน้ำยาราคาค่อนข้างแพง



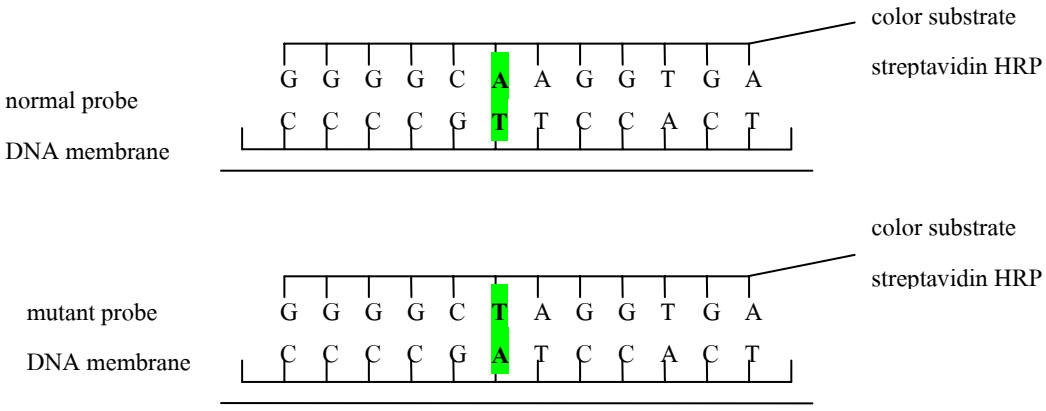
ภาพที่ 5 เปรียบเทียบโครงสร้างของ dNTP และ ddNTP ซึ่งเป็น analog ของ dNTP แต่ไม่มี OH group ที่จะทำให้ nucleotide ตัวใหม่เข้าไปต่อได้ (ลูกศรชี้)



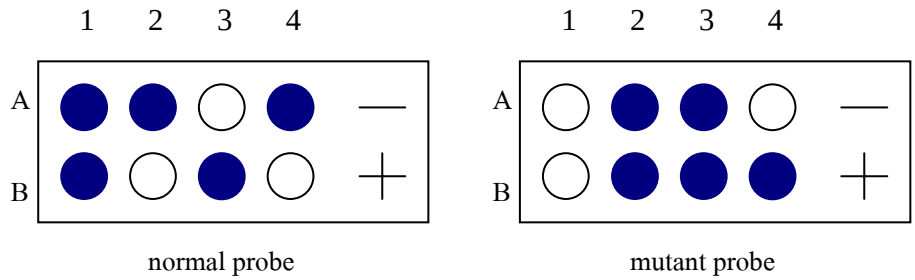
ภาพที่ 6 แสดงหลักการของการตรวจหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxy terminator method หรือ chain termination ของ Sanger และคณะ

2. วิธีตรวจบีตาธาลัสซีเมียที่ทราบชนิดการกลายพันธุ์ (Known mutation)

2.1 dot blot hybridization by allele specific oligonucleotide (ASO) หรือ allele specific oligonucleotide hybridization เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดการกลายพันธุ์ที่ทราบชนิดแล้วเท่านั้น โดยดูการจับเข้าคู่ระหว่าง oligonucleotide probe จำเพาะที่สังเคราะห์ขึ้น (allele specific oligonucleotide, ASO) กับ DNA ที่ต้องการศึกษาหาความผิดปกติ หลักการ คือ นำ DNA ที่ได้จากการทำ PCR มาผนึกติดบนแผ่นไนลอน แล้ว hybridize กับ oligonucleotide probe ที่จำเพาะกับอัลลีลที่สังเคราะห์ขึ้นให้มีเบสคู่สมกับชนิดการกลายพันธุ์แต่ละชนิด แล้วตรวจสอบผลการเข้าคู่ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีต่างๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของฉลากที่ติดกับ probe อาจเป็นสารกัมมันตภาพรังสี (^{32}P หรือ ^{35}S) ดิกอกซิจินิน (digoxigenin) หรือไบโอติน ซึ่งสามารถตรวจจับด้วยสารจำเพาะที่พ่วงด้วยโมเลกุลของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase หรือเอ็นไซม์ peroxidase เป็นต้น แล้วอ่านผลที่เกิดขึ้นจากการทำออโตราดิโอกราฟ หรือปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์กับสับสเตรท (substrate) (ภาพที่ 7)



ภาพ ก



ภาพ ข

ภาพที่ 7 แสดงการตรวจชนิดการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินด้วยวิธี allele specific oligonucleotide (ASO) hybridization (dot blot hybridization) สำหรับการกลายพันธุ์ที่ codon17 (A-T)

ก. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ใน mutant probe และ normal probe ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกันหนึ่งตำแหน่ง และการเกิด hybridization ของ DNA ที่ตรึงไว้บนแผ่นไนลอนกับ probe ที่ติดฉลากให้เกิดสี

ข. การเกิด hybridization ของ probe กับ DNA ทำให้เกิดสีเห็นเป็นจุดบนแผ่นไนลอน แผ่นซ้ายใช้ normal probe และแผ่นขวาใช้ mutant probe

ตำแหน่ง 4A เป็น DNA จากยีนปกติ ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานที่ให้ผลลบสำหรับเปรียบเทียบ (negative control) เกิด hybridization กับ normal probe ในแผ่นซ้าย และไม่เกิด hybridization กับ mutant probe ในแผ่นขวา

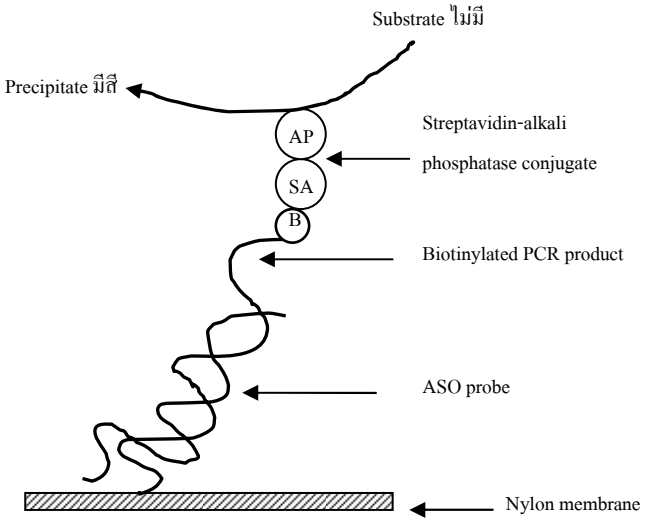
ตำแหน่ง 4B เป็น DNA จาก homozygous ของการกลายพันธุ์ที่ codon17 (A-T) ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานที่ให้ผลบวกสำหรับเปรียบเทียบ (positive control) ไม่เกิด hybridization กับ normal probe ในแผ่นซ้าย แต่เกิด hybridization กับ mutant probe ในแผ่นขวา

ตำแหน่ง 1A และ1B เป็น wild type ของการกลายพันธุ์ที่ codon17 เกิด hybridization กับ normal probe เท่านั้น

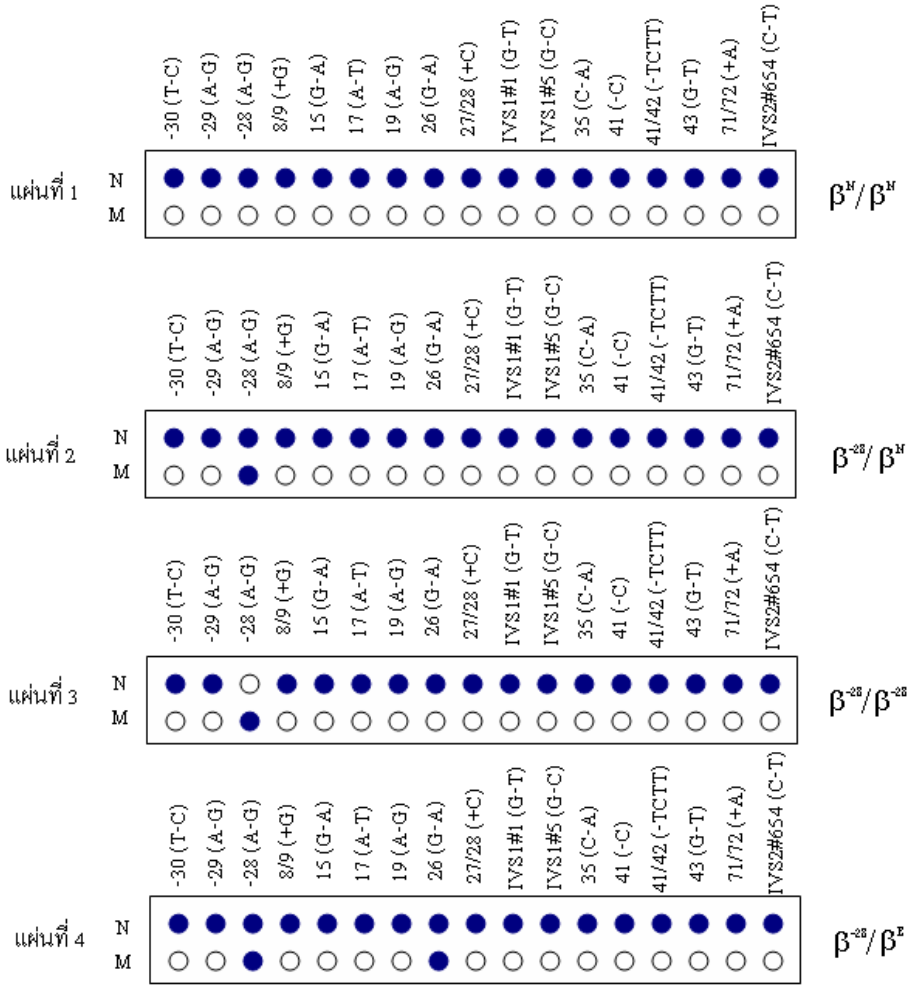
ตำแหน่ง 2A และ3B เป็น heterozygous ของการกลายพันธุ์ที่ codon17 เกิด hybridization กับ normal probe และ mutant probe

ตำแหน่ง 2B และ3A เป็น homozygous ของการกลายพันธุ์ที่ codon17 เกิด hybridization กับ mutant probe เท่านั้น

2.2 reverse dot blot hybridization วิธีนี้สามารถตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ได้หลายชนิดในคราวเดียวกัน เหมาะสำหรับการตรวจหาความผิดปกติของยีนในประชากรที่มีการกลายพันธุ์หลายชนิด หลักการ คือ ทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน (ทางด้าน 5' ของไพรเมอร์) แล้วนำ PCR product ที่ได้มาทำ hybridization กับ ASO probe ที่จำเพาะสำหรับการกลายพันธุ์แต่ละชนิด โดยการตรึง (immobilize) ASO probe แต่ละ probe ไว้เป็นจุด (dot) บนแผ่นไนลอน จัดเรียง probe ไว้เป็นคู่ๆ สำหรับตรวจหาอัลลีลปกติ (normal allele) และอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ (mutant allele) แต่ละชนิด แล้วทำ hybridization ระหว่าง PCR product (ที่มีสารไบโอติน) กับ ASO probe หลายๆ probe ที่ตรึงอยู่บนแผ่นไนลอน ถ้า PCR product มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่ (complementary) อย่างสมบูรณ์กับของ ASO probe ใดๆ ก็จะเกิด hybridization กับ probe นั้น สารไบโอตินบน PCR product จะจับกับ streptavidin-alkaliphosphatase (SA-AP) conjugate (ภาพที่ 8) (หรือ avidin-horseradish peroxidase, avidin-HRP) สามารถตรวจได้ว่ามีการจับของ PCR product กับ ASO probe และ SA-AP conjugate (หรือ avidin-HRP) โดยการเติม substrate ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ alkaliphosphatase (หรือ peroxidase) และเกิดเป็นจุดสีน้ำเงินเข้ม (หรือสีน้ำตาล) บนแผ่นไนลอน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 แสดงการตรวจด้วยวิธี reverse dot blot hybridization เมื่อนำ biotinylated PCR product มาทำ hybridization กับ allele-specific oligonucleotide probe (ASO probe) ที่ถูกตรึง (immobilized) อยู่บนแผ่นไนลอน ถ้ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันอย่างสมบูรณ์กับ ASO probe จะเกิดการจับกับของ biotin (B) ซึ่งอยู่บน PCR product กับ streptavidin-alkali phosphatase (SA-AP) conjugate และ alkali phosphatase จะทำปฏิกิริยากับ substrate เกิดสีน้ำเงินเข้ม



ภาพที่ 9 แสดงผลตัวอย่างการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินด้วยวิธี reverse dot blot hybridization ที่มี ASO probe ที่จำเพาะสำหรับการกลายพันธุ์หลายชนิดที่พบในคนไทยถูกตรึงบนแผ่นไนลอน โดยทุกชนิดมี ASO probe ในแถว N ที่จำเพาะต่ออัลลีลปกติ และในแถว M จำเพาะต่ออัลลีลที่มีการกลายพันธุ์

<u>แผ่นที่ 1</u> PCR product ของคนปกติ (β^N/β^N) เกิด hybridization กับ ASO probe ทุกชนิดในแถว N และให้ผลบวก (จุดสีน้ำเงิน) แต่ไม่เกิด hybridization กับ ASO probe ทุกชนิดในแถว M และให้ผลลบ (จุดสีขาว)

<u>แผ่นที่ 2</u> PCR product ของผู้ที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ -28 (β^N/β^{-28}) เกิด hybridization กับ ASO probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิด hybridization กับ ASO probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ -28

แผ่นที่ 3 PCR product ของผู้ที่เป็น homozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ -28 (β^{-28}/β^{-28}) เกิด hybridization กับ ASO probe เกือบทุกชนิดในแถว N ยกเว้นที่ตำแหน่ง -28 และไม่เกิด hybridization กับ ASO probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ -28

แผ่นที่ 4 PCR product ของผู้ที่เป็น compound heterozygous ของการกลายพันธุ์ที่ -28 และที่ codon26 (G-A) (β^{-28}/β^{E}) เกิด hybridization กับ ASO probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิด hybridization กับ ASO probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ -28 และที่ codon26

2.3 Amplification refractory mutation system (ARMS) หรือ allele specific amplification (ASA) ใช้สำหรับตรวจชนิดการกลายพันธุ์ที่พบบ่อย หลักการ คือ ทำ PCR ของ DNA ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด แยกกันคนละหลอด เพื่อตรวจสอบ DNA ปกติ และ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ ไพรเมอร์ข้างหนึ่งของทั้ง 2 ชุดนี้มีเบสเหมือนกันยกเว้นเบสตัวสุดท้ายที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ชุดที่ปกติจะ complementary กับเบสในคนปกติ และไพรเมอร์ชุดที่ตรวจสอบยีนผิดปกติจะ complementary กับเบสที่เกิดการกลายพันธุ์ ส่วนไพรเมอร์อีกข้างหนึ่งของแต่ละชุดมีลำดับเบสเหมือนกัน เนื่องจากเอ็นไซม์ *Taq* polymerase ไม่มีคุณสมบัติของ 3'-5' exonuclease (proof reading) การสังเคราะห์ DNA สายยาวออกไปโดยอาศัย PCR จะเกิดขึ้นได้เมื่อเบสทุกตัวของไพรเมอร์มี complementary กับ DNA template ดังนั้นใน DNA ปกติ PCR จะเกิดขึ้นเฉพาะหลอดที่มีไพรเมอร์ชุดที่ปกติ และ DNA ของคนที่เป็น heterozygous จะพบ PCR product ทั้งในหลอดที่มีไพรเมอร์ชุดปกติ และในหลอดที่มีไพรเมอร์ชุดที่ใช้ตรวจสอบชนิดการกลายพันธุ์ ส่วนผู้ป่วยที่เป็น homozygous ของการกลายพันธุ์ชนิดเดียวกัน จะพบ PCR product เฉพาะในหลอดที่ใช้ไพรเมอร์ชุดที่ตรวจสอบการกลายพันธุ์ชนิดนั้น การตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์อาจทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งสองชุดนี้อยู่ในหลอดเดียวกัน โดยการติดฉลากสารเรืองแสงต่างชนิดกันเข้าไปที่ปลายข้างหนึ่งของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์ DNA แต่ละชนิด เช่น ติดฉลากสาร fluoresceine เข้าไปที่ไพรเมอร์ข้างที่ปกติ จะได้ PCR product เป็นสีเขียว และติดฉลากสาร rhodamine เข้ากับไพรเมอร์ข้างที่ตรวจชนิดการกลายพันธุ์ จะได้ PCR product สีแดง เป็นต้น เมื่อทำ electrophoresis และส่องดูกับ UV หรือ spectrofluorometer จะเห็นแถบของ DNA ที่มีสีต่างกันตามชนิดของไพรเมอร์ ถ้าเป็น heterozygous จะเห็น DNA ที่เป็นสีผสม วิธีติดสารเรืองแสงเข้าไปที่ไพรเมอร์ และทำ PCR เพื่อตรวจสอบชนิดของยีนนี้ เรียกว่า Color Complement Assay (CCA)

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เก็บรวบรวม และคำนวณความถี่ชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่พบได้บ่อยและไม่บ่อยในผู้มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

2. ศึกษาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่ยังไม่ทราบชนิด (unidentified mutations)

3. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่พบได้ไม่บ่อยในประชากรไทยด้วยวิธี Reverse Dot Blot Hybridization (RDB)

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Mallinckrodt
Agarose	Gibthai
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-4-toluidine salt (BCIP)	Boehiringer-Mannheim
Bromophenol blue	Merck
Deoxyribonucleotide Triphosphate (dNTPs)	Invitrogen
Disodium-ethylenediamine tetra-acetate dehydrate (EDTA)	Merck
Ethidium Bromide (EtBr)	Sigma
1-Ethly-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCL (EDC)	Sigma
Mineral oil	Sigma
Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)	Boehiringer-Mannheim
Sodium acetate	Merck
Sodium carbonate	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Sigma
Sodium hydrogen carbonate	Merck
Sodium hydroxide	Merck
Tris (hydroxymethly) aminomethane (Trisma base)	Merck

2.1.2 Enzymes

เอนไซม์	บริษัทที่ผลิต
Proteinase K	Invitrogen
Streptavidin-alkaline phosphatase	Boehiringer-Mannheim
Taq DNA polymerase and reaction buffer	Invitrogen

2.1. Oligonucleotide primers and probes

Oligonucleotide primers ที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับ reverse dot blot hybridization มี biotin ติดอยู่ที่ปลาย 5' และใช้สำหรับทำ PCR sequencing สั่งซื้อจากบริษัท Pacificscience ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบิน และใช้ในการทำ PCR sequencing

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'-3')	ตำแหน่งบนยีนบีตาโกลบิน (NT_009237.18)
RDB1	Biotin-5'-AACTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGA-3'	5188465-5188442
RDB2	Biotin-5'-TCATTCGTCTGTTTCCCATTCTAAAC-3'	5187692-5187716
RDB3	Biotin-5'-TATCATGCCTCTTTGCACCATTCT-3'	5187209-5187186
RDB4	Biotin-5'-CACTGACCTCCCACATTCCCTTTT-3'	5186636-5186659
G7	5'-GATACAATGTATCATGCCTC-3'	5187218-5187199
G10	5'-AGACTAGCACTGCAGATTCCG-3'	5186126-5186146
S3	5'-TCCCATAGACTCACCCTGAA-3'	5187793-5187812
SN4	5'-GCCCATAACAGCATCAGGAG-3'	5187951-5187970

oligonucleotide probes ใช้ในการตรวจบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดมีหมู่อะมิโน (NH_2) ติดอยู่ที่ปลาย 5' สั่งซื้อจากบริษัท Pacificscience ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ASO probe ใช้ในการตรวจบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดด้วยวิธี reverse dot blot hybridization

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	จำนวนเบส				Mutations
				A	G	C	T	
R1 N	GGGCATAAAAGTCAGGG	17	52	6	7	2	2	-31 (A-G)
R1 M	TGACTTTTACGCCCAG	16	48	3	3	5	5	-31 (A-G)
R2 N	CATCTATTGCTTACATTTG	19	50	4	2	4	9	cap site +1
R2 M	CAAATGGAAGCAATAGAT	18	48	9	4	2	3	cap site +1
R3 N	ACAGACACCATGGTGC	16	50	5	4	5	2	Ini. nt2 (T-G)
R3 M	ACAGACACCAGGGTGC	16	52	5	5	5	1	Ini. nt2 (T-G)
R4 N	CCTGTGGGGCAAGGTGA	17	56	3	8	3	3	codon14/15 (+G)
R4 M	CCCTGGTGGGGCAAGG	16	56	2	8	4	2	codon14/15 (+G)
R5 M	CCTGGGGGCAAGGTG	15	52	2	8	3	2	codon15 (-T)
R6 N	CAGGGCCTCACCACCA	16	54	4	3	8	1	codon26 (G-T)
R6 M	AGGGCCTAACCACCAA	16	50	1	6	3	6	codon26 (G-T)
R7 N	ATACCAACCTGCCCAG	16	50	4	2	7	3	IVS1 nt1 (G-A)
R7 M	CTGGGCAGATTGGTAT	16	48	3	6	2	5	IVS1 nt1 (G-A)
R8 N	GTGGTCTACCCTTGGAC	18	54	2	5	5	5	codon35 (C-A)
R8 M	GTGGTCTAACCTTGGACC	18	56	3	5	5	5	codon35 (C-A)
R9 N	GACAAGCTGCACGTGGA	17	54	5	6	4	2	codon95 (+A)
R9 M	TGCAGCTTTGTCACAGTG	18	52	3	5	3	7	codon95 (+A)
R10 N	TGCACTGGTGGGGTGAA	17	54	4	2	8	3	codon123-125 (-ACCCCACC)
R10 M	GAATTCAGTGCAGGCTG	17	52	4	6	3	4	codon123-125 (-ACCCCACC)

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	จำนวนเบส				Mutations
				A	G	C	T	
R11 M	AGCCTGCCCTGGTGG	15	52	3	6	5	1	codon126 (GTG-GGG)
R12 N	CTGCCTAATAAAAAACATT	19	48	9	1	4	5	Poly A (AAA-AGA)
R12 M	CTGCCTAATAGAAAACAT	18	48	8	2	4	4	Poly A (AAA-AGA)
R13 N	ACAGACACCATGGTGC	16	50	5	4	5	2	Ini. nt2 (T-C)
R14 M	ACAGACACCACGGTGC	16	52	5	4	6	1	Ini. nt2 (T-C

2.1.4 อุปกรณ์

อุปกรณ์	Model	บริษัทที่ผลิต
Automated DNA sequence	ABI Prism 3130	Applied Biosystem, USA
Electrophoresis Gel System		JAPAN
Electrophoresis Power Supply		JAPAN
Hot plate		JAPAN
Micro high speed centrifuge	MC-150	JAPAN
Pipetman ขนาด p10, p20, p100, p1000 µl		Gibthai
Microwave		Nationnal
Refrigerator		Sharp
Shaking waterbath		JAPAN
Thermal Cycler	480	Perkin Elmer
หรือ Gene Cycler		Bio-Rad
UV transilluminator		Genesnap
Vortex		JAPAN

2.1.5 วัสดุ

วัสดุ	บริษัทที่ผลิต
Biodyne C nylon membranes	Gibthai
Pipette tip ขนาด p10, p20, p100, p1000 µl	Gibthai
Plastic bag	Thailand
Plastic microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml, 1.5 ml และ 2.0 ml	Gibthai
Plastic sealer	Thailand
Plastic tray	Gibthai
หน้ากากกันแสง UV	Gibthai

2.1.6 สารเคมีและน้ำยา (Reagents)

2.1.6.1 สารเคมีและน้ำยาสำหรับสกัด DNA จากเลือด และเซลล์ในน้ำคร่ำใช้น้ำยาสกัดชุด Genomic DNA Mini kit จากบริษัท Geneaid Biotech, Taiwan ประกอบด้วยสารเคมีและน้ำยา ดังนี้

- TE buffer
- GB buffer
- 10 mg/ml ของ proteinase K
- Absolute alcohol
- Elution buffer
- W1 buffer
- wash buffer

2.1.6.2 สารเคมีและน้ำยาสำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Deoxynucleotide triphosphates mixture (dNTPs mixture) ซึ่งประกอบด้วย dATP, dGTP, dTTP และ dCTP อย่างละ 2 mM
- 50 mM $MgCl_2$
- Mineral oil
- 10x PCR buffer ประกอบด้วย 100 mM Tris, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 0.1% (w/v) gelatin หรือ 1% Triron X-100

- PCR primers ความเข้มข้น 20 pmol/µl ได้แก่ Primer RDB1, RDB2, RDB3 และ RDB4
- เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase : 5U/µl

2.1.6.3 สารเคมีและน้ำยาสำหรับการเตรียม agarose gel electrophoresis

- 50x agarose gel buffer (50x TAE) ประกอบด้วย Trisma base (MW 121.24) 242 g, Glycial acetic acid 57.1 ml, 0.5 M EDTA pH 8.0 100 ml
- Electrophoresis running buffer (1x TAE) เตรียมโดยการเจือจาง 50x TAE 20 ml ด้วยน้ำกลั่น 980 ml
- 2% agarose : ชั่ง agarose 2 g เติม 1x TAE ให้ครบ 100 ml
- Ethidium bromide : 1 mg/L
- Gel loading buffer

2.1.6.4 สารเคมีและน้ำยาสำหรับการตรึง ASO-probes บนแผ่นไนลอนเมมเบรน

- 5-10 pmol/µl ของ ASO-probes ที่สังเคราะห์ขึ้น
- 16 % 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide HCL (EDC) solution เตรียมโดยชั่ง EDC 32 g ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 200 ml
- 0.5 M Sodium bicarbonate buffer, pH 8.4 ประกอบด้วย
  $NaHCO_3$ (MW 84.01) 4.2 g ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml,
  Na_2CO_3 (MW 106) 5.28 g ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml
  วัด pH ของ $NaHCO_3$ และปรับให้ได้ pH 8.4 ด้วย 0.5 M Na_2CO_3
- 0.1 N NaOH

2.1.6.5 สารเคมีและน้ำยาสำหรับ hybridization และ detection

- 10% SDS ประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (sodium lauryl sulfate) 20 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 ml
- 20x SSC ประกอบด้วย $NaCl_2$ (MW 58.44) 175.3 g, Trisodium citrate.$2H_2O$ (MW 294.10) 88.2 g ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml
- 20X SSPE ประกอบด้วย 3.6 M NaCl (MW 58.44) 210 g, 0.2 M $NaH_2PO_4.2H_2O$ (MW 156.01) 31.2 g, 20 mM EDTA disodiam (MW 372.24) 7.4 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และวัด pH ให้ได้ pH 7.4 ด้วย 10 M NaOH เติมน้ำจนครบ 1000 ml
- 1 M Tris pH 9.5 ประกอบด้วย Tris 121.12 g ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 9.5 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

- detection buffer ประกอบด้วย 1 M Tris pH 9.5 20 ml, 5 M NaCl (MW 58.44) 4 ml, 1 M $MgCl_2$ 1 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 ml
- hybridization buffer : 2x SSC/0.1% SDS เตรียมโดย 20x SSC 10 ml, 10% SDS 1 ml ละลายในน้ำกลั่น 89 ml
- washing buffer ประกอบด้วย 20X SSPE 100 ml, 10% SDS 10 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml
- Streptavidin-AP
- liquid NBT/BCIP

2.1.6.6 สารเคมีและน้ำยาสำหรับตรวจความผิดปกติของบีตาโกลบินยีนด้วยวิธี automated DNA sequencing

- Deoxynucleotide triphosphates mixture (dNTPs mixture) ซึ่งประกอบด้วย dATP, dGTP, dTTP และ dCTP อย่างละ 2 mM
- 50 mM $MgCl_2$
- Mineral oil
- 10x PCR buffer ประกอบด้วย 100 mM Tris, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 0.1% (w/v) gelatin หรือ 1% Triron X-100
- PCR primers ความเข้มข้น 20 pmol/µl ได้แก่ Primer RDB1, RDB2, G7, G10
- เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase : 5U/µl
- 50x agarose gel buffer (50x TAE) (เหมือนกับข้อ 2.1.6.3)
- Electrophoresis running buffer (1x TAE) (เหมือนกับข้อ 2.1.6.3)
- 2% agarose (เหมือนกับข้อ 2.1.6.3)
- Ethidium bromide (เหมือนกับข้อ 2.1.6.3)
- Gel loading buffer (เหมือนกับข้อ 2.1.6.3)
- PCR product purification kit (Montage PCR Centrifugal Filter Devices จากบริษัท Millipore, USA)
- 3 M sodium acetate
- 95% ethanol

2.1.7 ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บจากหลอดเลือดดำบริเวณต้นแขนประมาณ 3-5 ml ของผู้ที่ส่งตรวจบีตาธาลัสซีเมีย ณ หน่วยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ที่ให้ผลลบกับการตรวจ common β-thalassemia mutation แล้ว 20 ชนิด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 จนถึงปัจจุบัน ทั้งหมด 25 ราย ประกอบด้วยผู้ที่เป็น β-thalassemia trait จำนวน 18 ราย และผู้ที่เป็น β-thalassemia ร่วมกับ hemoglobin E จำนวน 7 ราย

2.2 วิธีดำเนินการ

2.2.1 การตรวจวัดระดับฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต และดัชนีเม็ดเลือดแดง (red cell indices)

บันทึกผลการหาค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง (complete blood count, CBC) จากเครื่องนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ (Sysmex R, K1000, Sysmex R, XT2000, Japan) ซึ่งประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังนี้ ระดับฮีโมโกลบิน (Hb), ฮีมาโตคริต (Hct), mean corpuscular volunm (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) และ red cell distribution width (RDW) และผลการตรวจปริมาณและชนิดฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง (HPLC) (VARIANTR, Bio Rad, USA)

2.2.2 การเตรียมตัวอย่าง DNA

2.2.2.1 การสกัด DNA จากเลือด (whole blood)

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ศึกษา คือ เลือดที่เจาะเก็บจากหลอดเลือดดำบริเวณต้นแขนประมาณ 3-5 ml โดยเจาะใส่ขวดปลอดเชื้อที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง เลือดที่นำมาสกัด DNA ต้องนำเลือดมาปั่นแยก buffy coat ก่อน ซึ่งเป็นชั้นของเม็ดเลือดขาวที่อยู่ระหว่างชั้นของพลาสมาและชั้นของเม็ดเลือดแดง โดย centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 ml เก็บรักษาที่ -20ºC นำ buffy coat มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัด Genomic DNA Mini kit (Geneaid Biotech, Taiwan) ด้วยขั้นตอนดังนี้ ล้างเซลล์ด้วย TE buffer ใส่ใน 1.5 ml centrifuge tube นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,600 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เทส่วนน้ำด้านบนออก ดีดตะกอนให้แตก ใส่ GB buffer 200 µl และ proteinase K 20 µl นำไป incubate ที่ 58ºC เป็นเวลา 10-30 นาที จนตะกอนถูกย่อยหมด หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่

อุณหภูมิห้องแล้วเติม absolute alcohol 200 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ทันที ถ่ายใส่ GD column ระหว่างนี้นำ Elution buffer ไป incubate ใน water bath ที่ 58ºC แล้ว centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเทน้ำที่ก้นหลอดทิ้ง แล้วเติม W1 buffer 400 µl นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเทน้ำที่ก้นหลอดทิ้ง แล้วเติม wash buffer ที่เติม absolute ethanol แล้ว 400 µl นำไปcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเทน้ำที่ก้นหลอดทิ้ง แล้วนำไป centrifuge อีกครั้ง ที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นนำส่วนของ column ใส่ใน 1.5 ml tube แล้วเติม Elution buffer 200 µl ที่ incubate แล้ว วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูด solution ด้านล่างใส่ใน column อีกครั้ง แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ได้ DNA จากเลือดที่สามารถนำไปใช้ตรวจหาความผิดปกติต่อไป

2.2.2.2 การสกัด DNA จากเซลล์น้ำคร่ำ [Amniotic cell (AF)] และ cell culture

ปริมาตรที่ใช้ประมาณ 10-20 มิลลิลิตร สามารถเจาะเก็บได้ในช่วงอายุครรภ์ 14-18 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงที่ครรภ์มีน้ำคร่ำและเซลล์มากพอ นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัด Genomic DNA Mini kit (Geneaid Biotech, Taiwan) ด้วยขั้นตอนดังนี้ นำ AF ใส่ใน 15 ml centrifuge tube นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,600 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนน้ำด้านบนทิ้ง ดีดตะกอนและใช้ pipette ดูดใส่ใน 1.5 ml centrifuge tube ใส่ TE buffer 1.5 ml เพื่อล้างเซลล์ mix ด้วย pipette แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา เท TE buffer ทิ้งและเติม TE buffer 1.5 ml mix ด้วย pipette แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเท TE buffer ทิ้งและเติม TE buffer 1.5 ml mix ด้วย pipette แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาใช้ pipette ดูด TE buffer ออกให้หมด (ระวังอย่าดูดตะกอนของ AF ทิ้ง) แล้วเติมน้ำกลั่น 45 µl, 10x PCR buffer 5 µl และ proteinase K 2 µl แล้วนำไป incubate ที่ 58ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาต้มในน้ำเดือด 7 นาที หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ได้ DNA จากเซลล์น้ำคร่ำที่สามารถนำไปใช้ตรวจหาความผิดปกติต่อไป

2.2.2.3 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณ DNA โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณ DNA ทำได้โดยนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1 ต่อ 50 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้คิวเวตต์ขนาด 1 เซนติเมตร ซึ่ง DNA วัดการดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร การตรวจสอบคุณภาพของ DNA จะวัดความบริสุทธิ์ของ DNA (DNA purification) จากค่า OD ratio โดยค่า OD ratio = OD_{260} / OD_{280}

กำหนดให้ OD_{260} = ค่าการดูดกลืนช่วงแสงของ DNA

OD_{280} = ค่าการดูดกลืนช่วงแสงของโปรตีน

ถ้าค่าที่ได้มากกว่า 1.9 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของ RNA แต่ถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1.5 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน ค่าความบริสุทธิ์ของ DNA ที่เหมาะสมควรมีค่าในช่วง 1.8-2.0 แสดงว่า DNA ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ทำ PCR ต่อไป (จำนงค์ นพรัตน์, 2548)

การวัดปริมาณ DNA จะคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย DNA โดยคำนวณเทียบว่าสารละลาย DNA เข้มข้น 50 µg/ml สามารถดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (OD_{260}) เท่ากับ 1 (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, 2545)

2.2. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

เมื่อได้ DNA ที่ต้องการตรวจหาชนิดการกลายพันธ์จากการสกัด DNA แล้ว นำตัวอย่าง DNA มาเพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบิน โดยใช้ส่วนผสมตามตารางที่ 7 และใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด คือ

ชุดที่ 1 เพิ่มปริมาณในช่วง promoter ถึงส่วนต้นของ intron 2

ชุดที่ 2 เพิ่มปริมาณในช่วง intron 2 (รวม IVS2 nt654) ถึงบริเวณส่วนท้ายของ Poly A

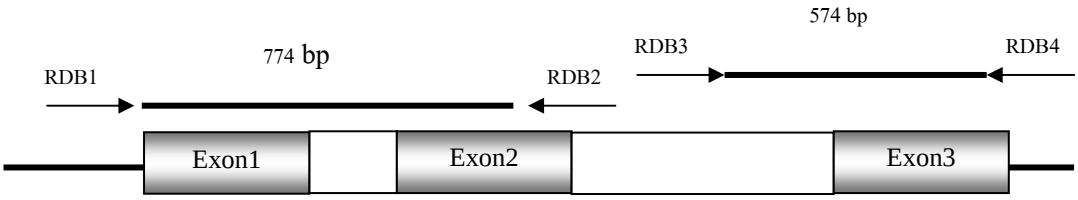
ไพรเมอร์ที่ใช้คือ RDB1 : Biotin-5'-AACTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGA-3'

RDB2 : Biotin-5'-TCATTCGTCTGTTTCCCATTCTAAAC-3'

RDB3 : Biotin-5'-TATCATGCCTCTTTGCACCATTCT-3'

RDB4 : Biotin-5'-CACTGACCTCCCACATTCCCTTTT-3'

โดยไพรเมอร์แต่ละตัวติดฉลากด้วย biotin ตำแหน่งไพรเมอร์ทั้ง 4 ตัว และขนาด PCR products แสดงในไดอะแกรมที่ 4



ไดอะแกรมที่ 4 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ RDB1, RDB2, RDB3 และ RDB4 บนยีนบีตาโกลบิน และแสดงขนาดของ PCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด คือ ขนาด 774 bp จากไพรเมอร์ RDB1 และ RDB2 และ 574 bp จากไพรเมอร์ RDB3 และ RDB4

ตารางที่ 7 แสดงส่วนประกอบของ PCR mixture ในหลอด microtube

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
สารละลาย DNA (100-200 ng/µl)	2.0
50 mM $MgCl_2$	3.0
10x PCR buffer	5.0
2 mM dNTPs	5.0
20 pmol/µl primer RDB 1	2.0
20 pmol/µl primer RDB 2	2.0
20 pmol/µl primer RDB 3	2.0
20 pmol/µl primer RDB 4	2.0
5 units of *Taq* DNA polymerase	0.3
Distilled water	26.7
Total	50.0

ขั้นตอนการทำ PCR โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) ดังนี้

Denaturation	95°C	5	นาที	1	cycle
Denaturation	95°C	1	นาที	40	cycles
Annealing	58°C	3	นาที		
Extension	72°C	1	นาที		
Extension	72ºC	10	นาที	1	cycle

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ดูดสารละลายใต้ mineral oil 5 µl ผสมกับ gel loading buffer 2 µl บนแผ่น parafilm แล้วหยอดลงหลุมใน 2% agarose gel และทำ electrophoresis ใน agarose gel buffer, pH 8 ด้วยความต่างศักย์คงที่ที่ 50 volt ประมาณ 25-30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแช่เจลในสารละลาย ethidium bromide นาน 5 นาที เพื่อย้อม DNA และ destain ในน้ำกลั่น 5-10 นาที ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสง ultraviolet เพื่อยืนยันว่ามี PCR product เกิดขึ้น

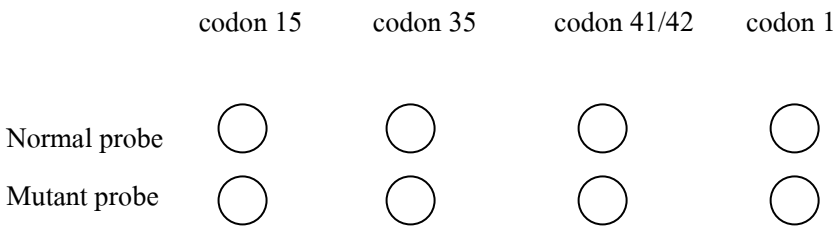
2.2.4 การตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียเฉพาะจุดโดยใช้วิธี reverse dot-blot hybridization

2.2.4.1 การเตรียม ASO-probe strips

สร้าง NH_2 labeled ASO-probe โดยมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 6 และมีหมู่อะมิโน (NH_2) ติดอยู่ที่ปลาย 5' ASO probes ควรมีจำนวนนิวคลิโอไทด์ 17-19 เบส เพื่อให้มี Tm ประมาณ 48-54^{o}C นำ ASO probes มาติดบนแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีประจุลบ (Biodyne C, Pall Biosupport, NY) โดย activate carboxyl group บนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย 16% 1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl (EDC, sigma E 7750) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วซับให้แห้งสนิทบนกระดาษ 3 M วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง

ละลาย ASO probes ใน 0.5 M sodium bicarbonate buffer, pH 8.4 ให้มีความเข้มข้นประมาณ 2-5 pmol/µl ดูดมา 1.5 µl ด้วย micropipet แล้วหยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนให้ตรงตามตำแหน่งชนิดการกลายพันธุ์ที่ทำเครื่องหมายไว้ก่อน (ภาพที่ 10) แล้วทิ้งให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแช่ใน 0.1 M NaOH นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อ neutralize เมมเบรน แล้ว

ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง หรือนำมาใช้สำหรับทำ hybridization ได้ทันที



ภาพที่ 10 แสดงตัวอย่างการ dot oligonucleotide probes ระหว่าง normal probe และ mutant probe ที่เป็นคู่กัน

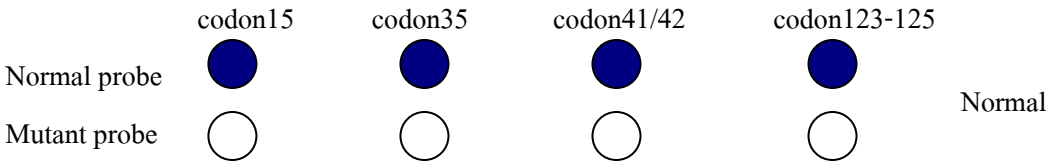
2.2.4.2 การทำ Hybridization

นำ PCR product มาทำปฏิกิริยากับ ASO-probe strip โดยแช่แผ่นเมมเบรนใน prehybridization buffer (20x SSPE/0.1% SDS) 2 ml ใน plastic tray ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 45°C เป็นเวลา 15 นาที ขณะเดียวกัน denature PCR product โดยต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วดูดใส่ plastic tray ที่มี prehybridized membrane อยู่ จากนั้นนำไป hybridized ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 45°C เป็นเวลา 45 นาที แล้วล้างเมมเบรนด้วย washing buffer (20x SSPE/0.1% SDS) ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 48°C เป็นเวลา 15 นาที เนื่องจาก PCR มี biotin ติดอยู่ทำให้สามารถตรวจสอบผล hybridization ได้ โดยใช้ enzymatic color-reaction โดยนำ hybridized strip มา incubate กับ streptavidine alkaline phosphatase ในสารละลาย blocking solution (Blocking powder/1 M Tris pH 7.5/4 M NaCl) เขย่านาน 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 0.3% Tween 2 ml 1 ครั้ง นาน 10 นาที และล้างใน detection buffer (1 M tris pH 9.5, 1 M $MgCl_2$, 4 M NaCl) 2 ml นาน 1 นาที เติม substrate NBT 15 µl และ BCIP 10 µl ที่ละลายใน detection buffer 3 ml ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที ผลบวกจะเกิดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้ม

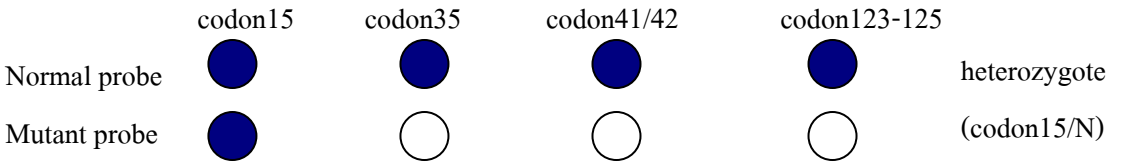
2.2.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

อ่านผลด้วยตา ผลบวก (positive) จะเกิดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้มบนแผ่นเมมเบรน และผลลบ (negative) ไม่เกิดจุดสีน้ำเงินเข้มบนเมมเบรน

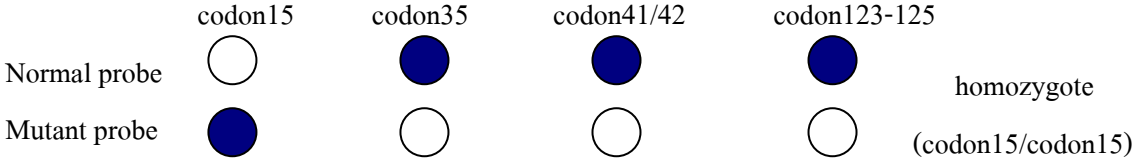
ในรายที่มียีนบีตาโกลบินปกติทั้ง 2 อัลลีล (normal) จะพบว่า ASO probe ที่จำเพาะกับอัลลีลปกติ (normal probe) ให้ผลบวกทุกจุด และ ASO probe สำหรับอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ (mutant probe) ให้ผลลบทุกจุด ดังรูป



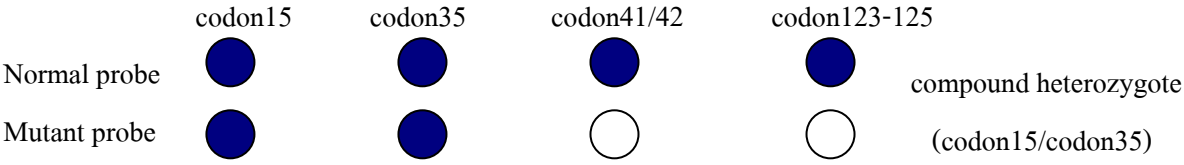
ส่วนรายที่เป็น heterozygote ของยีนบีตาโกลบินจะพบว่า normal probe เกิดผลบวกทุกจุด ส่วน mutant probe ให้ผลบวก 1 จุดตรง probe ที่จำเพาะกับชนิดการกลายพันธุ์นั้น ดังรูป



ส่วนรายที่เป็น homozygote ของยีนบีตาโกลบินจะพบว่า normal probe ให้ผลลบหนึ่งจุดตรง probe ที่จำเพาะกับชนิดการกลายพันธุ์นั้น ส่วน mutant probe จะให้ผลบวกตรงจุดที่คู่กัน ดังรูป



และสำหรับรายที่เป็น compound heterozygote ของยีนบีตาโกลบินจะพบว่า normal probe ให้ผลบวกทุกจุด และ mutant probe จะให้ผลบวก 2 จุด ดังรูป



2.2.5 การตรวจหาลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Automated DNA sequencing)

นำตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี reverse dot-blot hybridization มาตรวจหาความผิดปกติด้วยวิธีตรวจหาลำดับเบสด้วยเทคนิค automated DNA sequencing โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ Automate Genetic Analysis (ABI Prism 3130, Applied Biosystems, USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.5.1 การเตรียม DNA เป้าหมาย หรือ DNA template

นำตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมีย มาเตรียม DNA template ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการศึกษา (ไดอะแกรมที่ 5) แยกปฏิกิริยาออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 เพิ่มปริมาณในช่วง promoter ถึงส่วนต้นของ intron 2 ใช้ไพรเมอร์คือ

RDB1 : 5’-AACTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGA-3’

RDB2 : 5’-TCATTCGTCTGTTTCCCATTCTAAAC-3’

ส่วนที่ 2 เพิ่มปริมาณในช่วง intron 2 (รวม IVS2#654) ถึงบริเวณส่วนท้ายของ Poly A ใช้ไพรเมอร์คือ

G7 : 5’-GATACAATGTATCATGCCTC-3’

G10 : 5’-AGACTAGCACTGCAGATTCC-3’

2.2.5.2 การทำผล PCR ให้บริสุทธิ์

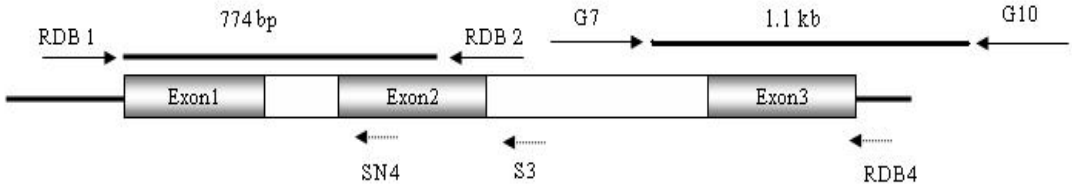
ผล PCR ที่ได้ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปหาลำดับเบส เพื่อกำจัดสารต่างๆที่เหลือจากปฏิกิริยา PCR เช่น primers, dNTP หรือ DNA polymerase เป็นต้น โดยใช้ชุดสกัด Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, Bedford, USA)

2.2.5.3 การทำปฏิกิริยา sequencing

ส่วนผสมของปฏิกิริยา sequencing ประกอบด้วย DyeDeoxy Terminator 1 µl, 1.6 pmol/µl primer 1 µl, PCR-DNA template 1 µl และ Distilled water 7 µl รวมปริมาตรทั้งหมด 10 µl ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยา sequencing (ไดอะแกรมที่ 5) สำหรับส่วนที่ 1 คือ S3 : 5'-TCCCATAGACTCACCCTGAA-3' และ SN4 : 5'-GCCCATAACAGCATCAGGAG-3' สำหรับส่วนที่ 2 คือ RDB4 : Biotin-5'-CACTGACCTCCCACATTC CCTTTT-3'

โดยมีขั้นตอนการทำ PCR โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (P480, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) ดังนี้

Denaturation	96°C	3	นาที	1	cycle
Denaturation	96°C	0.30	นาที	25	cycles
Annealing	50°C	0.15	นาที		
Extension	60°C	4	นาที		



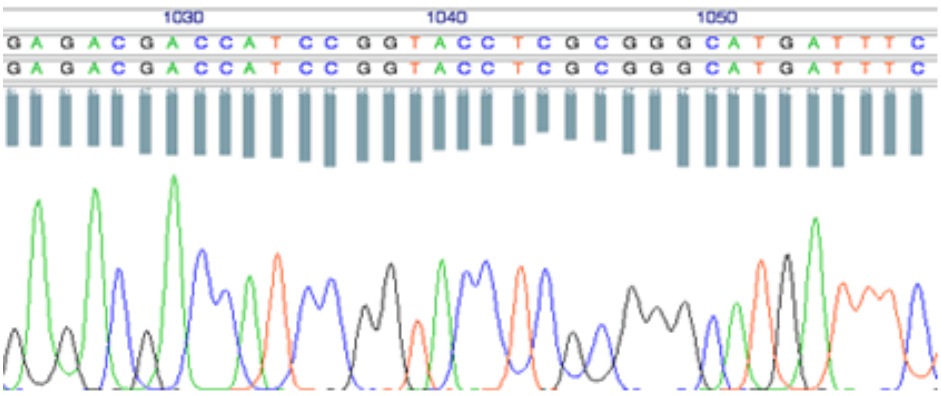
ไดอะแกรมที่ 5 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ RDB1, RDB2, G7 และ G10 บนยีนบีตาโกลบิน และขนาดของ PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุด คือ ขนาด 774 bp จากไพรเมอร์ RDB1 และ RDB2 และ 1.1 kb จากไพรเมอร์ G7 และ G10 และแสดงตำแหน่ง sequencing primers คือ SN4, S3 และ RDB4

2.2.5.4 การตกตะกอน PCR sequencing

ตกตะกอนผล PCR ที่ได้ด้วย 1.5 µl ของ 3 M sodium acetate, 31.25 µl ของ 95% ethanol และ 7.25 µl ของ distilled water ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำตะกอนมาละลายใน loading buffer 12 µl แล้วปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ต้มที่ 95ºC เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา แช่ในน้ำแข็งทันที ก่อนใช้ pipette ดูดใส่หลุมเจล 12 µl

2.2.5.5 การทำอิเล็คโตรโฟริซิส และเก็บวิเคราะห์ข้อมูล

หลังจากใช้ pipette ดูดใส่หลุมเจล 12 µl ทำอิเล็คโตรโฟริซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า และเวลาตามคำแนะนำในคู่มือการใช้ Automate Genetic Analysis, ABI Prism 3130, Applied Biosystems ขณะเดียวกันเปิดโปรแกรม data collection ในเครื่องคอมพิวเตอร์และเลือกปุ่ม collect เพื่อเก็บข้อมูล หลังจากทำอิเล็คโตรโฟริซิส ใช้โปรแกรม data analysis เพื่อวิเคราะห์ข้อมูล (ขั้นตอนนี้สามารถตั้งค่าให้คอมพิวเตอร์ทำเองโดยอัตโนมัติ) ข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จะแสดงเป็นโครมาโตแกรม (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงตัวอย่างโครมาโตแกรมที่อ่านได้จากเครื่องอัตโนมัติผ่านทางจอคอมพิวเตอร์จากโปรแกรม Data analysis ของ ABI

2.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

จากการศึกษาหาชนิดการกลายพันธุ์ของยีนบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิดของผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์โดยศึกษาชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดจำนวน 25 ราย (unknown cases) นำผลการตรวจดังกล่าวมาคำนวณค่าความถี่ของชนิดการกลายพันธุ์คิดเป็นร้อยละของจำนวนอัลลีลที่ศึกษาทั้งหมด

$$\text{ความถี่ของชนิดการกลายพันธุ์ (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวน allele ของชนิดการกลายพันธุ์}}{\text{จำนวน allele ทั้งหมด (50 alleles)}} \times 100$$

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 ผลการตรวจวัดระดับฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต และดัชนีเม็ดเลือดแดง (red cell indices)

ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมีย โดยผู้ป่วยจะมีระดับฮีโมโกลบิน (Hb) ฮีมาโตคริต (Hct) ต่ำ และ MCV < 80 fl, MCH < 25 pg, การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียว (one tube osmotic fragility test หรือ one tube OF test) < 80%, HbA_2 > 3.5% และให้ผลบวกกับการทดสอบฮีโมโกลบินไม่เสถียรโดยการตกตะกอนสีด้วยดีซีไอพี [dichlorophenol-indol (DCIP) precipitaion test] ผลการตรวจของตัวอย่างที่นำมาศึกษา 25 ราย (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการตรวจเลือดจากเครื่องนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ และผลการตรวจปริมาณและชนิดฮีโมโกลบินอัตโนมัติใช้ความดันสูง (HPLC) ของ unknown cases ทั้งหมด 25 ราย

DNA code	Hematological data										
	OF (%)	DCIP	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	RDW (%)	Hb typing	%Hb A_2	%Hb E	%Hb F
T19163	34	ND	10.0	31.0	69	ND	ND	AA_2	5.9	0	ND
T23079	33	ND	13.1	40.0	59	ND	ND	AA_2	6.0	0	ND
T25384	66	0	9.4	29.0	62	19.9	17.6	AA_2	5.5	0	ND
T29665	48	0	8.2	25.4	60	19.2	17.5	AA_2	5.8	0	ND
T30384	34	0	9.5	30.0	61	19.6	17.4	AA_2	5.4	0	ND
T30576	76	0	13.6	41.0	77	25.5	14.6	AA_2	3.9	0	ND
T31064	51	0	11.1	35.0	58	18.3	18.5	AA_2	5.9	0	ND
T31581	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	AA_2	4.3	0	ND
T33668	ND	ND	7.3	24.0	62	19.1	30.3	FE	0	57.7	42.3
T33829	ND	ND	6.3	19.2	62	20.3	33.7	FE	0	67.7	32.3
T33977	ND	ND	4.0	11.0	47	17.7	ND	FE	0	56.0	44

ตารางที่ 8 (ต่อ)

DNA code	Hematological data										
	OF %)	DCIP	Hb g/dl)	Hct %)	MCV fl)	MCH pg)	RDW %)	Hb typing	%Hb A_2	%Hb E	%Hb F
T35890	ND	ND	6.9	22.0	70	23.0	31.0	FE	0	51.8	48.2
T36139	ND	ND	5.7	18.1	61	19.3	31.2	FE	0	41.4	54.2
T37344	ND	ND	8.3	25.8	78	25.0	28.0	FE	0	ND	ND
T37675	91	0	14.1	43.0	75	24.7	15.2	AA_2	4.9	0	ND
T38344	58	0	13.3	29.4	63	21.4	18.3	AA_2	5.8	0	ND
T38864	ND	ND	10.1	32.1	73	22.8	15.1	AA_2	6.4	0	ND
T39123	86	0	11.2	35.1	72	23.0	13.3	AA_2	3.8	0	ND
T40312	ND	0	9.0	29.0	63	ND	ND	AA_2	5.3	0	ND
T40316	ND	ND	7.2	21.2	58	19.6	38.8	AFE	ND	ND	ND
T40436	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	AA_2	6.2	0	ND
T40649	73	0	14.4	43.7	83	27.2	15.4	AA_2	5.3	0	ND
T40951	29	0	12.1	36.2	49	16.3	22.4	AA_2	6.5	0	ND
T41300	ND	ND	10.3	30.0	65	16.2	ND	ND	ND	ND	ND
T41301	ND	ND	7.9	23.0	87	18.5	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Not Done

3.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ที่สกัดได้

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ที่สกัดได้จากวิธีใช้ชุดน้ำยาสกัด Genomic DNA Mini kit โดยใช้เม็ดเลือดขาว (buffy coat) จากตัวอย่างของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิด จำนวน 25 ราย (unknown cases) ตรวจสอบจากการวัดการดูดกลืนแสงของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm (OD_{260}) วัดการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm (OD_{280}) และวัดความบริสุทธิ์ของ DNA (DNA purification) จากค่า OD ratio = OD_{260} /OD_{280} ซึ่งค่า OD ratio ที่อยู่ระหว่าง 1.8–2.0 แสดงถึง DNA มีความบริสุทธิ์ดี เหมาะที่จะนำไปใช้งานต่อไป นำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ DNA จากค่า 1 OD_{260}= 50 µg x dilution factor จากผลการศึกษาการตรวจสอบคุณภาพของ DNA จากตัวอย่างผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิดจำนวน 25 ราย พบว่าค่า OD ratio อยู่ในช่วงประมาณ 1.0-1.7 (ตารางที่ 9) ซึ่งคุณภาพและปริมาณของ DNA มีเพียงพอที่จะนำไปเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

ตารางที่ แสดงค่าการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA จากเลือดตัวอย่างผู้ป่วยที่สกัดได้

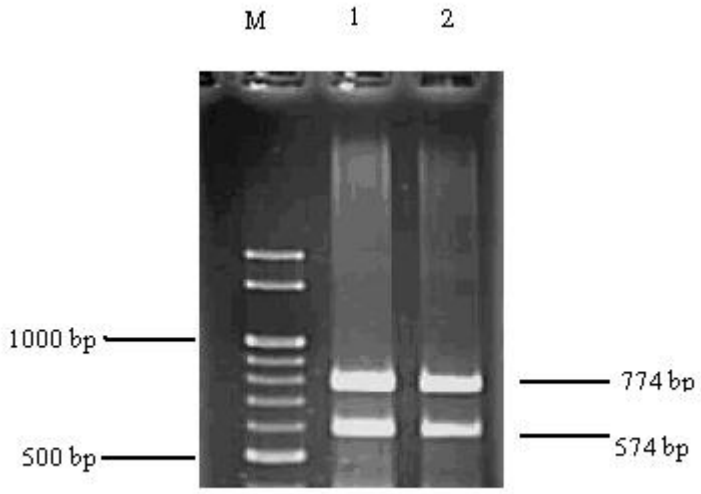
DNA Code	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260} /OD_{280}	Concentration (µg/µl)
T19163	0.206	0.119	1.730	0.514
T23079	0.065	0.053	1.228	0.163
T25384	0.051	0.038	1.348	0.127
T29665	0.052	0.042	1.247	0.130
T30384	0.117	0.076	1.538	0.292
T30576	0.114	0.077	1.469	0.284
T31064	0.090	0.083	1.087	0.225
T31581	0.052	0.036	1.445	0.130
T33668	0.139	0.096	1.437	0.346
T33829	0.087	0.076	1.146	0.217
T33977	0.173	0.121	1.422	0.432
T35890	0.059	0.053	1.117	0.148
T36139	0.048	0.035	1.380	0.120

ตารางที่ □(ต่อ)

DNA Code	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260} /OD_{280}	Concentration (µg/µl)
T37344	0.071	0.045	1.575	0.176
T37675	0.052	0.036	1.445	0.130
T38344	0.223	0.150	1.485	0.558
T38864	0.123	0.095	1.297	0.308
T39123	0.051	0.038	1.348	0.127
T40312	0.122	0.095	1.284	0.310
T40316	0.071	0.045	1.575	0.176
T40436	0.094	0.083	1.132	0.235
T40649	0.095	0.083	1.144	0.237
T40951	0.107	0.094	1.145	0.268
T41300	0.090	0.083	1.087	0.225
T41301	0.076	0.070	1.095	0.190

3.3 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบิน ด้วยวิธี PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษามี 2 ชุด คือ ไพรเมอร์ RDB1 และRDB2 ใช้เพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบินขนาด 774 bp และไพรเมอร์ RDB3 และRDB4 ใช้เพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบินขนาด 574 bp ภาพที่ 12)



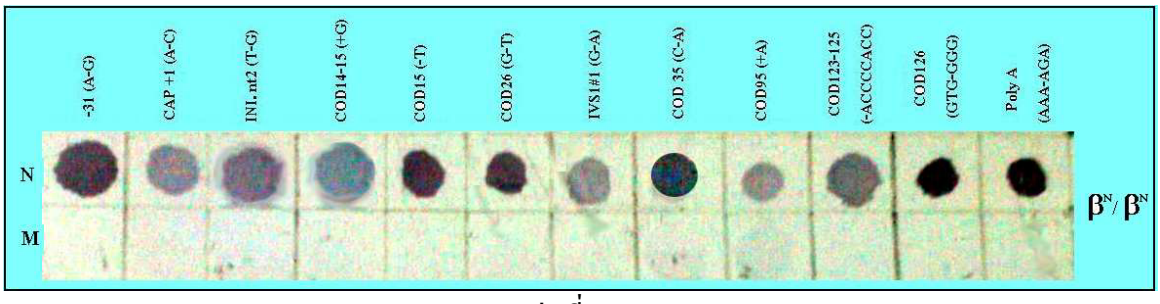
ภาพที่ 12 ภาพแสดงแถบขนาด DNA ของตัวอย่างผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียจากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction PCR) เปรียบเทียบกับแถบขนาด DNA มาตรฐาน

Lane M	DNA size marker øX174 RF DNA/Hae III)
Lane 1 – Lane 2	ตัวอย่างผล DNA ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ขนาดของ DNA คือ ไพรเมอร์ RDB1/RDB2 = 774 bp และไพรเมอร์ RDB3/RDB4 = 574 bp

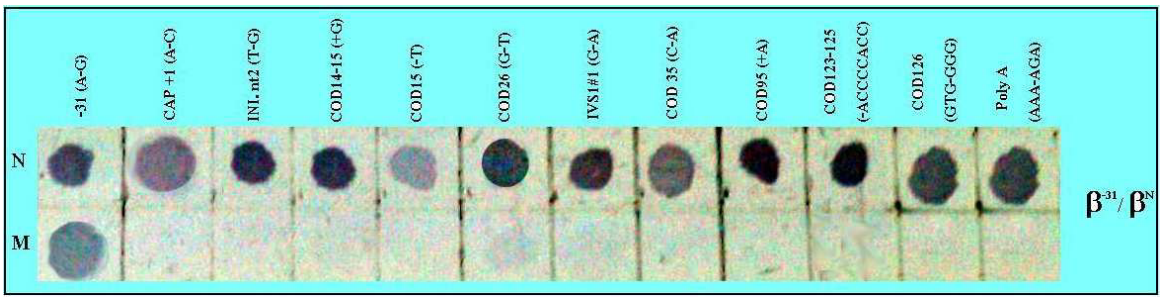
3.4 การตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียเฉพาะจุด โดยวิธี reverse dot-blot Hybridization

การใช้วิธี reverse dot blot hybridization ในการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมีย จะช่วยให้สามารถตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ได้ครั้งละหลายชนิดในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ซึ่งหลักการของวิธีนี้ คือ การใช้ ASO probes หลายๆ ชนิดที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) มายึดติดบนแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีประจุลบ แล้วนำ DNA ของผู้ป่วยมาทำ PCR โดยให้ PCR product มี biotin ติดอยู่ แล้วมา hybridize กับ ASO probe ที่ติดอยู่บนเมมเบรน แล้วตรวจสอบปฏิกิริยา hybridization โดยใช้ enzymatic color-detection

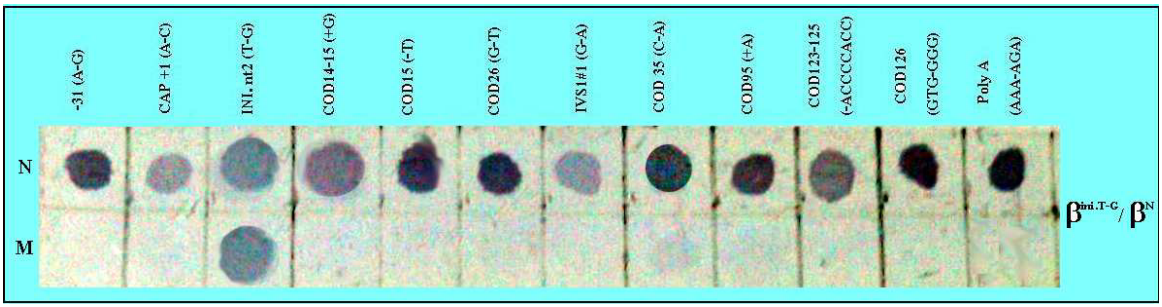
จากผลการศึกษาค้นคว้าข้อมูลของชนิดบีตาธาลัสซีเมียที่พบได้ไม่บ่อยในประเทศไทยและที่พบในประเทศใกล้เคียง ทำให้สามารถออกแบบ oligonucleotide probe ที่ใช้สำหรับตรวจชนิดบีตาธาลัสซีเมียด้วยวิธี reverse dot blot hybridization ได้ 12 ชนิด ซึ่งผลการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิดจำนวน 25 ราย สามารถตรวจพบชนิดของบีตาธาลัสซีเมียได้ทั้งหมด 7 ชนิด (ภาพที่ 13) คือ ชนิด -31 (A-G) จำนวน 2 ราย, Ini. nt2 (T-G) จำนวน 2 ราย, codon15 (-T) จำนวน 5 ราย, IVS1 nt1 (G-A) จำนวน 8 ราย, codon35 (C-A) จำนวน 2 ราย, codon123-125 (-ACCCCACC) จำนวน 2 ราย และ Poly A (AAA-AGA) จำนวน 3 ราย นอกจากนี้ยังพบว่ามี 1 รายที่ยังไม่สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งจะทำการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Automated DNA sequencing ต่อไป



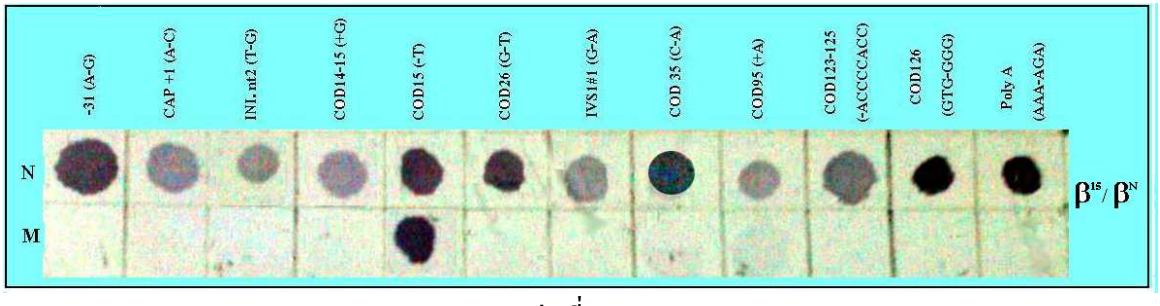
แผ่นที่ 1



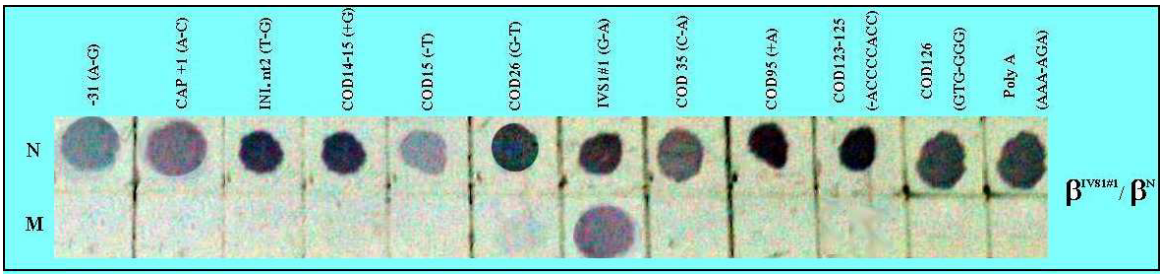
แผ่นที่ 2



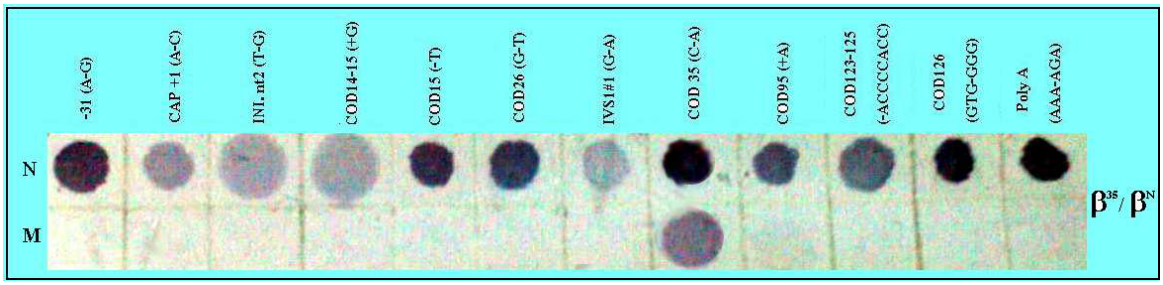
แผ่นที่ 3



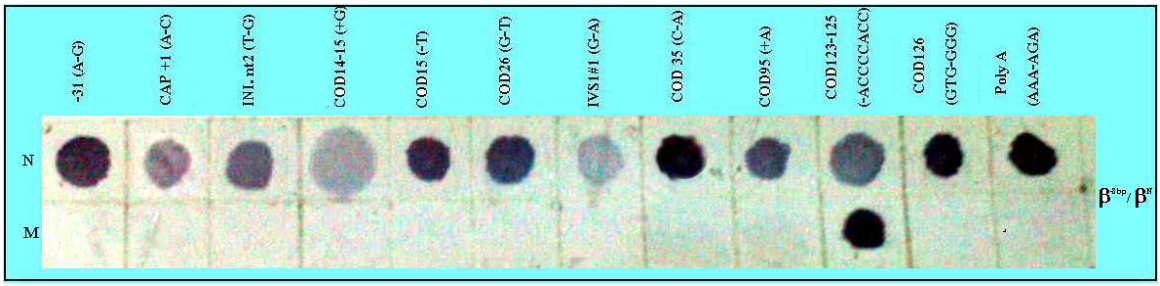
แผ่นที่ 4



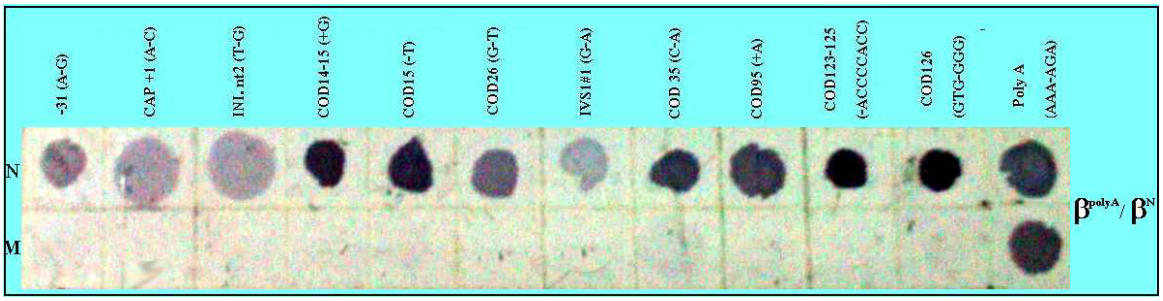
แผ่นที่ 5



แผ่นที่ 6



แผ่นที่ 7



แผ่นที่ 8

ภาพที่ 13 แสดงผลการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียด้วยวิธี reverse dot blot hybridization ที่มี oligonucleotide probe ที่จำเพาะสำหรับชนิดการกลายพันธุ์ 12 ชนิดที่ถูกตรึงบน

แผ่นไนลอนเมมเบรน โดยทุกชนิดมี oligonucleotide probe ในแถว N ที่จำเพาะต่ออัลลีลปกติ และในแถว M จำเพาะต่ออัลลีลที่มีการกลายพันธุ์

แผ่นที่ 1 แสดงแผ่นเมมเบรนของคนปกติ (β^N/β^N) เกิด hybridization กับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N และให้ผลบวก (จุดสีน้ำเงิน) แต่ไม่เกิด hybridization กับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว M และให้ผลลบ (ไม่เกิดจุดสีน้ำเงิน)

แผ่นที่ 2 แสดงแผ่นเมมเบรนของผู้ที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ -31 (β^N/β^{-31}) เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ -31 (A-G)

แผ่นที่ 3 แสดงแผ่นเมมเบรนของผู้ที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ Ini. nt2 ($\beta^N/\beta^{ini.nt2}$) เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ Ini. nt2 (T-G)

แผ่นที่ 4 แสดงแผ่นเมมเบรนของผู้ที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ codon15 (β^N/β^{15}) เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ codon15 (-T)

แผ่นที่ 5 แสดงแผ่นเมมเบรนของผู้ที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ IVS1 nt1 ($\beta^N/\beta^{IVS1\#1}$) เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ IVS1 nt1 (G-A)

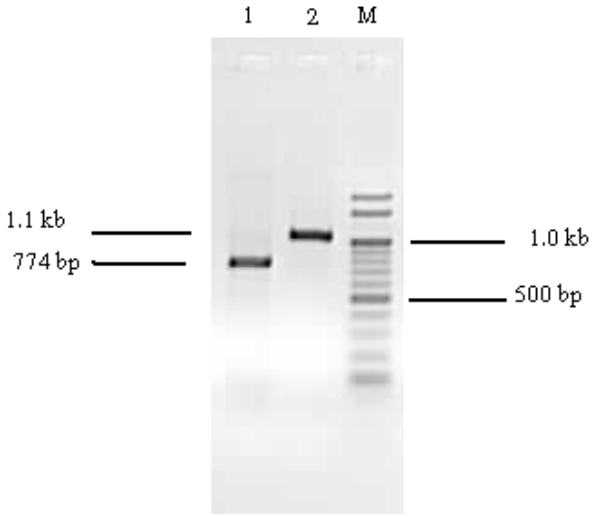
แผ่นที่ 6 แสดงแผ่นเมมเบรนของผู้ที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ codon35 (β^N/β^{35}) เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ codon35 (C-A)

แผ่นที่ 7 แสดงแผ่นเมมเบรนของผู้ที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ codon123-125 ($\beta^N/\beta^{123-125}$) เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ codon123-125 (-ACCCCACC)

แผ่นที่ 8 แสดงแผ่นเมมเบรนของผู้ที่เป็น heterozygous สำหรับการกลายพันธุ์ที่ Poly A (β^N/β^{polyA}) เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N และไม่เกิดจุดสีน้ำเงินกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว M ยกเว้นชนิดที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ที่ Poly A (AAA-AGA)

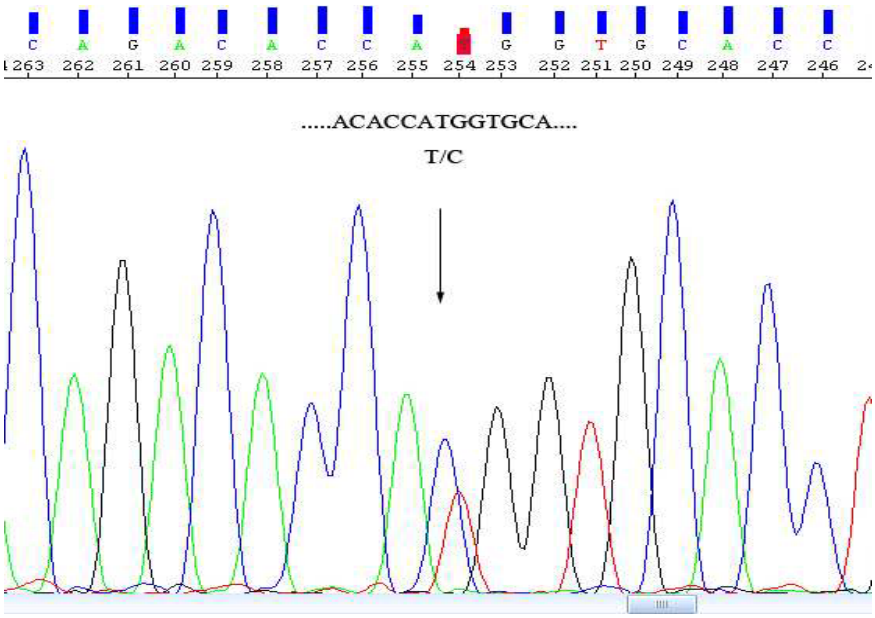
3.5 การตรวจหาลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Automated DNA sequencing)

นำตัวอย่างผู้ป่วย 1 ราย ที่ยังไม่สามารถหาชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียได้ด้วยวิธี reverse dot-blot hybridization มาตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการตรวจหาลำดับเบสด้วยวิธี automated DNA sequencing โดยเริ่มจากการเตรียม DNA template ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ RDB1 และRDB2 เพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบินในช่วง promoter ถึงส่วนต้นของ intron 2 และใช้ไพรเมอร์ G7 และG10 เพิ่มปริมาณยีนบีตาโกลบินในช่วง intron 2 (รวม IVS2 nt654) ถึงบริเวณส่วนท้ายของ Poly A (ภาพที่ 14) นำผล PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสารต่างๆที่เหลือจากปฏิกิริยา PCR หลังจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR sequencing ตกตะกอนผล PCR ด้วย sodium acetate แล้วนำไปทำอิเล็คโตรโฟริซิสด้วยเครื่องอัตโนมัติ พบชนิดการกลายพันธุ์เพิ่มอีก 1 ชนิดบริเวณ Initiation codon nucleotide ตัวที่ 2 [Ini. nt2 (T-C)] (ภาพที่ 15) แล้วยืนยันผลการตรวจด้วยวิธี reverse dot-blot hybridization (ภาพที่ 16)

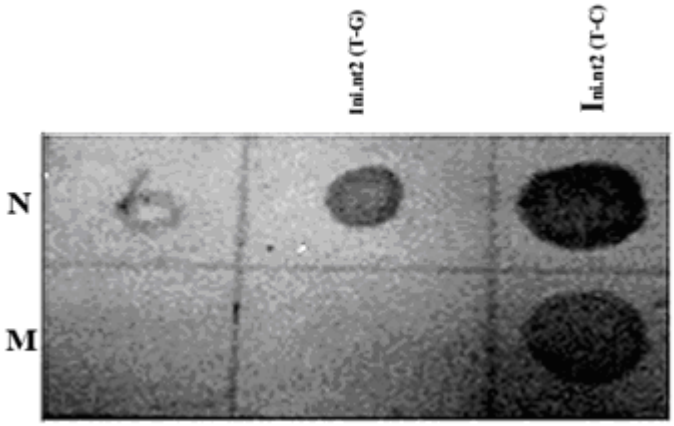


ภาพที่ 14 แสดงแถบขนาด DNA template ที่ใช้ในปฏิกิริยา sequencing ของตัวอย่างผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียจากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เปรียบเทียบกับแถบขนาด DNA มาตรฐาน

Lane M	DNA size marker (øX174 RF DNA/Hae III)
Lane 1	ตัวอย่างผล DNA ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียจากการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ RDB1 และRDB2 ขนาดของ DNA คือ 774 bp
Lane 2	ตัวอย่างผล DNA ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียจากการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ G7 และG10 ขนาดของ DNA คือ 1.1 kb



ภาพที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมที่อ่านได้จากเครื่องอัตโนมัติผ่านทางจอคอมพิวเตอร์ที่แปลงข้อมูลจากโปรแกรม Data analysis ของ ABI3130 แสดงตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์บริเวณ Initiation codon nucleotide ตัวที่ 2 [Ini. nt2 T-C)]



ภาพที่ 16 แสดงแผ่นไนลอนเมมเบรนสำหรับการกลายพันธุ์ที่ Initiation codon nucleotide ตัวที่ 2 [Ini. nt2 T-C)] เกิดจุดสีน้ำเงินเข้มกับ oligonucleotide probe ทุกชนิดในแถว N ไม่เกิดจุดสีน้ำเงินเข้มกับตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ Ini. nt2 T-G) แต่เกิดจุดสีน้ำเงินเข้มที่ตำแหน่งการกลายพันธุ์ Ini. nt2 T-C) ในแถว M

จากการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียชนิดเฉพาะจุดที่ยังไม่ทราบชนิด จำนวน 25 ราย โดยใช้วิธี reverse dot-blot hybridization และ automate DNA sequencing สามารถตรวจพบชนิดการกลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 8 ชนิด และค่าความถี่ของแต่ละชนิดสามารถสรุปตามตารางที่ 10

นอกจากนี้ผลจากการศึกษาความถี่และชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียชนิดเฉพาะจุดในภาคใต้ในครั้งนี้ สามารถนำมาเปรียบเทียบกับความถี่และชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียชนิดเฉพาะจุดในภาคใต้ที่เคยมีรายงานในอดีตได้ ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 10 ผลการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียเฉพาะจุดที่ยังไม่ทราบชนิด จำนวน 25 ราย (50 alleles) และความถี่ของการกลายพันธุ์แต่ละชนิดคิดเป็นร้อยละของตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด

ชนิดของบีตาธาลัสซีเมีย	**จำนวนอัลลีล** (allele)	**ความถี่ชนิดการกลายพันธุ์** (ร้อยละ)
-31 (A-G)	2	4
Ini. nt2 (T-G)	2	4
Ini. nt2 (T-C)	1	2
codon15 (-T)	5	10
IVS1 nt1 (G-A)	8	16
codon35 (C->A)	2	4
codon123-125 (-ACCCCACC)	2	4
Poly A (AAA-AGA)	3	6
Hb E allele	7	14
Normal allele	18	36
Total	50	100

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบความถี่และชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดของบีตาธาลัสซีเมียจากการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาในอดีตของภาคใต้ (Nopparatana *et al*., 1995)

ชนิดการกลายพันธุ์	การศึกษาในอดีต		การศึกษาครั้งนี้	
	จำนวนอัลลีล	ความถี่ (ร้อยละ)	จำนวนอัลลีล	ความถี่ (ร้อยละ)
codon41/42 (-TCTT)	85	31.60	63	22.50
IVS1 nt5 (TGG-TGC)	53	19.70	54	19.29
codon19 (AAC-AGC)	43	15.99	14	5.00
-28 (AAA-AGA)	16	5.95	42	15.00
codon17 (AAG-TAG)	32	11.90	32	11.43
IVS2 nt654 (C-T)	6	2.23	18	6.43
IVS1 nt1 (GT-TT)	17	6.32	13	4.64
codon71/72 (+A)	ND	ND	6	2.14
IVS1 nt1 (G->A)	2	0.74	9	3.21
codon15 (-T)	ND	ND	7	2.50
codon15 (TGG-TAG)	1	0.37	1	0.36
codon41 (-C)	4	1.49	6	2.14
codon35 (C->A)	ND	ND	2	0.71
Poly A (AAA-AGA)	ND	ND	3	1.07
codon123-125	ND	ND	2	0.71
-31 (A-G)	ND	ND	2	0.71
codon8/9 (AGT-AGGT)	1	0.37	1	0.36
cap site +1 (A-C)	1	0.37	1	0.36
codon27/28 (+C)	ND	ND	1	0.36
Ini. nt2 (T-G)	ND	ND	2	0.71
Ini. nt2 (T-C)	ND	ND	1	0.36
-86 (C-G)	ND	ND	0	0
codon26 (G-T)	ND	ND	0	0
codon43 (G-T)	ND	ND	0	0

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ชนิดการกลายพันธุ์	การศึกษาในอดีต		การศึกษาครั้งนี้	
	จำนวนอัลลีล	ความถี่ (ร้อยละ)	จำนวนอัลลีล	ความถี่ (ร้อยละ)
codon14/15 (+G)	ND	ND	0	0
-87 (C-A)	ND	ND	0	0
codon95 (+A)	ND	ND	0	0
Unknown	8	2.97	0	0
Total	269	100	280	100

บทที่ 4
บทวิจารณ์ผลการวิจัย

บีตาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติของการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินที่ลดลง หรือสังเคราะห์ไม่ได้เลย ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดและลำดับเบสได้ตลอดทั้งสายบีตาโกลบิน บีตาธาลัสซีเมียจึงมีชนิดการกลายพันธุ์ที่หลากหลาย จนถึงปัจจุบันทั่วโลกมีรายงานชนิดการกลายพันธุ์แล้วกว่า 200 ชนิด สำหรับประเทศไทยมีรายงานประมาณ 40 ชนิด (Vathana *et al*., 2005) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มชนิดการกลายพันธุ์ที่มีความถี่สูงในประชากรไทยเกือบทุกภูมิภาครวมทั้งประเทศใกล้เคียง 10 ชนิด หรือที่เรียกว่า common β-thalassemia คือ codon26 (G-A) หรือ Hb E, codon41/42 (-□C□□), codon17 (A-□), IVS2 nt654 (C-□), IVS1 nt1 (G-□), IVS1 nt5 (G-C), codon19 (A-G) หรือ Hb Malay, codon35 (C-A), codon71/72 (+A) และ -28 (A-G) และกลุ่มชนิดการกลายพันธุ์ที่พบได้น้อยในประชากรไทยและประเทศใกล้เคียงกว่า 25 ชนิด หรือที่เรียกว่า uncommon β-thalassemia นอกจากนี้ยังพบว่ามีบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิดการกลายพันธุ์ด้วย (unknown mutation) ทั้งนี้การศึกษาความถี่เก็บรวบรวมข้อมูลชนิดการกลายพันธุ์ของ common β-thalassemia, uncommon β-thalassemia และ unknown mutation มีความสำคัญและจำเป็น เนื่องจากการศึกษาเพื่อทราบชนิดการกลายพันธุ์จะช่วยบอกความรุนแรงของบีตาธาลัสซีเมียเมื่อเกิดร่วมกับ β-thalassemia ชนิดอื่นๆได้ เพราะความรุนแรงของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียขึ้นกับชนิดของบีตาธาลัสซีเมีย หมายถึง ขึ้นอยู่กับปริมาณการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินว่าสังเคราะห์ได้ลดลง (β^+) หรือไม่ได้เลย (β^0) และจำเป็นต่อการให้คำปรึกษาแนะนำทางด้านพันธุศาสตร์ในครอบครัวผู้ป่วยธาลัสซีเมีย เพราะปัจจุบันโรคบีตาธาลัสซีเมียยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมรักษาได้ วิธีที่ดีที่สุด คือ การป้องกันไม่ให้ทารกเกิดใหม่เป็นโรค ทำได้โดยการตรวจกรองหาผู้ที่เป็นพาหะในคู่สามีภรรยา โดยเฉพาะคู่ที่กำลังจะมีบุตร หากคู่ใดเป็นพาหะทั้งคู่จะต้องตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของแต่ละคน จากนั้นเมื่อมีการตั้งครรภ์ก็สามารถเลือกตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอด (prenatal diagnosis) ว่ามีโอกาสจะเป็นโรคหรือไม่ โดยการใช้ตัวอย่างตรวจจากชิ้นเนื้อรก (chorionic villi) เซลล์น้ำคร่ำ (amniotic fluid) หรือการเจาะเลือดของทารกจากสายสะดือ (cord blood) ซึ่งจะช่วยให้ข้อมูลที่ถูกต้องแก่คู่สามีภรรยาที่เป็นคู่เสี่ยงและต้องการมีบุตร จะได้เป็นทางเลือกในการมีบุตรที่ไม่เป็นโรค หรือยุติการตั้งครรภ์กรณีที่บุตรเป็นบีตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง การศึกษาถึงรูปแบบชนิดการกลายพันธุ์จึงมีความสำคัญต่อการวางแผนและควบคุมโรค

นอกจากนี้ชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียจะมีความจำเพาะในแต่ละเผ่าพันธุ์ (Fucharoen and Winichagoon, 1992) เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง IVS1 nt5 (G-C) จะพบได้บ่อยมากในประเทศอินเดียทางตะวันตกเฉียงใต้ (Furuumi *et al*., 1998) พบในประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซียได้ร้อยละ 49-54 ในประเทศไทยพบร้อยละ 4.3 ของภาคกลาง แต่ภาคใต้พบได้สูงกว่าพบร้อยละ 18.8 อาจเป็นไปได้ว่าภาคใต้อยู่ติดประเทศมาเลเซีย มีโอกาสได้รับการถ่ายทอดยีนที่ใกล้เคียงกับที่พบในประเทศมาเลเซียมากกว่าภาคอื่นๆ (Lie-Injo *et al*., 1989; Laosombat *et al*., 1992; Fucharoen and Winichagoon, 1997) ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันประเทศไทยได้ให้ความสนใจศึกษาเรื่องบีตาธาลัสซีเมียมาโดยตลอด เนื่องจากมีอุบัติการณ์ของผู้ที่มียีนบีตาธาลัสซีเมียทั้งประเทศเป็นจำนวนมากถึงร้อยละ 3-9 (Vathana *et al*., 2005) จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจบีตาธาลัสซีเมียที่เหมาะสม คือ reverse dot-blot hybridization เพื่อที่สามารถตรวจชนิดการกลายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถพบได้ในประเทศไทย การศึกษา วิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธี reverse dot-blot hybridization ในการตรวจหาชนิดของบีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ซึ่งวิธีนี้ทำให้ตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ได้หลายชนิดในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ต่างจากการทำ dot-blot hybridization ที่สามารถตรวจสอบได้เพียงครั้งละหนึ่งชนิดเท่านั้น ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการตรวจวินิจฉัยชนิดของบีตาธาลัสซีเมีย (Winichagoon *et al*., 1999)

งานวิจัยนี้ศึกษาบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียจำนวน 25 ราย ซึ่งยังไม่ทราบชนิด (unknown mutation) ที่ผ่านการตรวจบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่พบบ่อยแล้วจำนวน 20 ชนิด มาตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์โดยวิธี reverse dot blot hybridization และ DNA sequencing โดยรวบรวมข้อมูลชนิดการกลายพันธุ์ที่พบได้ในประเทศใกล้เคียง (Winichagoon *et al*., 1992; Nopparatana *et al*., 1995; Sriroongrueng *et al*., 1997; Charoenkwan P *et al*., 2002; Vathana *et al*., 2005; ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรีและคณะ, 2546) แล้วจึงออกแบบ oligonucleotide probes ที่ใช้สำหรับตรวจชนิดการกลายพันธุ์ที่พบได้ไม่บ่อยในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง 12 ชนิด คือ -31 (A-G) เป็นบีตาบวกธาลัสซีเมีย มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์จาก A เปลี่ยนเป็น G ที่บริเวณ promoter พบบ่อยในประเทศญี่ปุ่น (Vathana *et al*., 2005), cap site +1 (A-C) เป็นบีตาบวกธาลัสซีเมีย มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์จาก A เปลี่ยนเป็น C ที่บริเวณ cap site ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ mRNA พบบ่อยในประเทศสิงคโปร์ร้อยละ 8.27 และประเทศไทยพบร้อยละ 0.12 (Wong *et al*., 1987), Ini. nt2 (□-G) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย เกิดความผิดปกติที่บริเวณ initiation codon ซึ่งเป็นรหัสของกรดอะมิโนตัวแรก คือ methionine เปลี่ยนเป็น arginine พบบ่อยในประเทศเกาหลีร้อยละ 29.17 (Lam *et al*., 1990 and Koo *et al*., 1992), codon14/15 (+G) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย มีการเพิ่มเข้ามาของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตัว (G)

ระหว่าง codon14 และ codon15 ทำให้มีความคลาดเคลื่อนในการอ่านรหัส เกิดรหัสหยุดขึ้นที่ codon22 เคยมีรายงานในประเทศจีน สำหรับประเทศไทยพบร้อยละ 0.12 (Chan *et al*., 1988), codon15 (-□) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตัว (□) ที่ codon15 ทำให้มีความคลาดเคลื่อนในการอ่านรหัส เกิดรหัสหยุดขึ้นที่ codon18 เคยพบในคนไทย 3 ราย ร่วมกับฮีโมโกลบินอี (Winichagoon *et al*., 1992) และพบเป็นครั้งแรกในภาคใต้ในผู้ป่วยจำนวน 2 ราย (นลินอร นุ้ยปลอด, 2548) พบในครอบครัวชาวมาเลเซีย (Fucharoen *et al*., 1990), codon26 (G-□) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์จาก G เปลี่ยนเป็น □ ที่ codon26 ทำให้เปลี่ยนเป็นรหัสหยุดขึ้นที่ codon นี้ พบในประเทศไทยร้อยละ 0.12 พบในคนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ภาคอื่นๆไม่พบ (Fucharoen *et al*., 1990), IVS1 nt1 (G-A) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์จาก G เปลี่ยนเป็น A ทำให้ splicing เกิดขึ้นไม่ได้ตามปกติ และได้ mRNA ที่ผิดปกติ พบได้บ่อยในประเทศเสปนร้อยละ 31.79 พบได้ทั่วไปในประชากรชาวเอเชีย ตะวันออกกลาง ไซปรัส และประเทศไทยพบร้อยละ 0.24 (Baysal *et al*., 1992; Benito *et al*., 1996; Oner *et al*., 1990), codon35 (C-A) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์จาก C เปลี่ยนเป็น A ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก tyrosine เป็นรหัสหยุด พบในประเทศญี่ปุ่นร้อยละ 0.32 และประเทศไทยพบร้อยละ 1.22 (□hein *et al*., 1990; Fucharoen *et al*., 1989), codon95 (+A) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย มีการเพิ่มเข้ามาของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตัว (A) ที่ codon95 ทำให้มีความคลาดเคลื่อนในการอ่านรหัส เกิดรหัสหยุดขึ้นที่ codon101 พบในประเทศไทยร้อยละ 0.12 (Winichagoon *et al*., 1992), codon123-125 (-ACCCCACC) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 ตัว ที่ codon123-125 ทำให้มีความคลาดเคลื่อนในการอ่านรหัส เกิดรหัสหยุดขึ้นที่ codon136 (Fucharoen *et al*., 1991), codon126 (□-G) เป็นบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์จาก □เปลี่ยนเป็น G ที่ codon126 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก valine เป็น glysine พบได้ในประเทศเยอรมัน ประเทศอิตาลี และประเทศไทย (Divoky *et al*., 1992) และ Poly A (AAA-AGA) เป็นบีตาบวกธาลัสซีเมีย มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์จาก A เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1,586 ของยีนบีตาโกลบิน ทำให้ mRNA มีเสถียรภาพน้อยลง พบได้ในประเทศสิงคโปร์ร้อยละ 1.5 และประเทศมาเลเซียร้อยละ 0.58 (Jankovic *et al*., 1990) จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบชนิดการกลายพันธุ์ทั้งหมด 7 ชนิด คือ -31 (A-G) จำนวน 2 ราย, Ini. nt2 (□-G) จำนวน 2 ราย, codon15 (-□) จำนวน 5 ราย, IVS1 nt1 (G-A) จำนวน 8 ราย, codon35 (C-A) จำนวน 2 ราย, codon123-125 (-ACCCCACC) จำนวน 2 ราย และ Poly A (AAA-AGA) 3 ราย ส่วนอีก 1 รายไม่สามารถตรวจด้วยวิธี reverse dot-blot hybridization ได้จึงใช้วิธี automate DNA sequencing เข้ามา

ช่วยในการตรวจหาความผิดปกติของยีน ทำให้พบชนิดการกลายพันธุ์อีก 1 ชนิด คือ Ini. nt2 (□-C) จำนวน 1 ราย

การตรวจพบการกลายพันธุ์ -31 (A-G) จำนวน 1 รายนั้น พบเป็นครั้งแรกในภาคใต้ของประเทศไทย เป็นการกลายพันธุ์ที่มีความถี่สูงในประเทศญี่ปุ่นมากถึงร้อยละ 14.2 (□akihara *et al*., 1986) พบในประเทศไทยน้อย พบเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 2005 (Vathana *et al*., 2005) เป็นความผิดปกติที่บริเวณ promoter ในส่วนของ □A□A box (A□AAAA) ทำให้การสังเคราะห์สายบีตาโกลบินลดลง ส่วนการกลายพันธุ์ที่ Ini. nt2 (□-C) ทำให้การแปลรหัสโปรตีนเปลี่ยนจาก methionine เปลี่ยนเป็น threonine ทำให้เกิดบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย พบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เป็นการกลายพันธุ์ที่พบในประเทศโครเอเชียร้อยละ 2.27, ประเทศญี่ปุ่นร้อยละ 0.63 และประเทศรัสเซียร้อยละ 1.6 (Jankovic L *et al*., 1990) อีกทั้งยังเคยมีรายงานในประเทศยูโกสลาเวีย (Jankovic L *et al*., 1990) และประเทศเบลเยี่ยม (Wildmann C *et al*., 1993) จากการค้นพบชนิดการกลายพันธุ์ใหม่ในครั้งนี้ทำให้เราสามารถออกแบบ oligonucleotide probe เพื่อใช้สำหรับการตรวจด้วยวิธี reverse dot blot hybridization สำหรับการตรวจหาบีตาธาลัสซีเมียที่พบได้ไม่บ่อยเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชนิด เพื่อครอบคลุมการวินิจฉัยชนิดของบีตาธาลัสซีเมียได้เพิ่มขึ้น

การศึกษาบีตาธาลัสซีเมียชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดจากตัวอย่างผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่ห้องปฏิบัติการหน่วยธาลัสซีเมีย ภาคพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นโรงพยาบาลศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในภาคใต้ จึงนับเป็นตัวแทนในการศึกษาหาความถี่ชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียในภาคใต้ของประเทศไทยได้ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ความถี่ของชนิดการกลายพันธุ์ที่พบได้ในประชากรภาคใต้ทั้งหมด ตามลำดับดังนี้ คือ codon41/42 (-□□), IVS1 nt5 (G-C), -28 (A-G), codon17 (A-□), IVS2 nt654 (C-□), IVS1 nt1 (G-□), IVS1 nt1 (G-A), codon15 (-□), codon71/72 (+A), codon41 (-C), codon35 (C-A), Poly A (AAA-AGA), codon123-125 (-ACCCCACC), -31 (A-G), codon8/9 (+G), cap site +1 (A-C), codon27/28 (+C), Ini. nt2 (□-G) และ Ini. nt2 (□-C) (ตารางที่ 10) การทราบถึงความถี่และชนิดการกลายพันธุ์ของบีตาธาลัสซีเมียจะเป็นประโยชน์ในการตรวจหาผู้ที่เป็นพาหะรวมทั้งจะเป็นประโยชน์ในการให้คำแนะนำทางพันธุศาสตร์สำหรับคู่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรค และการตรวจวินิจฉัยบีตาธาลัสซีเมียในทารกก่อนคลอดจะช่วยให้ข้อมูลที่ถูกต้องแก่คู่สามีภรรยาที่เป็นคู่เสี่ยงและต้องการมีบุตร จะได้เป็นทางเลือกในการมีบุตรที่ไม่เป็นโรค หรือยุติการตั้งครรภ์กรณีที่บุตรเป็นโรคชนิดรุนแรง ซึ่งเป็นวิธีป้องกันโดยการลดจำนวนผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียรายใหม่

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บีตาธาลัสซีเมีย เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเป็นส่วนใหญ่ ทำให้ชนิดการกลายพันธุ์เกิดได้หลากหลาย สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดทั้งสายของยีนบีตาโกลบิน ทั่วโลกมีรายงานกว่า 2□□ชนิด สำหรับประเทศไทยมีรายงานกว่า 4□ชนิด ความรุนแรงของโรคจะขึ้นกับชนิดของบีตาธาลัสซีเมียว่าสามารถสังเคราะห์สายบีตาโกลบินได้น้อยลงหรือสังเคราะห์ไม่ได้เลย ดังนั้นผลการศึกษาชนิดการกลายพันธุ์จึงมีความสำคัญต่อการพยากรณ์ความรุนแรงของโรคได้ จากการศึกษาครั้งนี้ พบชนิดการกลายพนธุ์ทั้งหมด 8 ชนิด คือ -31 (A-G), Ini. nt2 (T-G), Ini. nt2 (T-C), codon15 (-T), IVS1 nt1 (G-A), codon35 (C-A), codon123-125 (-ACCCCACC) และ Poly A (AAA-AGA) พบการกลายพันธุ์ชนิดที่ไม่เคยมีรายงานในภาคใต้ คือ -31 (A-G) จำนวน 2 ราย และพบการกลายพันธุ์หนึ่งชนิดที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย คือ Ini. nt2 (T-C) จำนวน 1 ราย ทำให้สามารถวินิจฉัยผู้ป่วยได้ครอบคลุมทุกราย

อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีการย้ายถิ่น หรือการติดต่อกับต่างประเทศ กับประเทศเพื่อนบ้าน ทำให้ความหลากหลายของการกลายพันธุ์บีตาธาลัสซีเมียในแต่ละกลุ่มประชากรเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา การศึกษาวิจัยเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ใหม่ๆควรจะทำอย่างต่อเนื่องใน unknown cases เพื่อให้สามารถให้บริการตรวจผู้ป่วยและทารกในครรภ์ได้ทุกราย

บรรณานุกรม

จำนงค์ นพรัตน์. 2548. การหาลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติ. ในการประยุกต์ใช้เทคนิคอณูชีววิทยาทางการแพทย์. โรงพิมพ์นำผล. หน้า 43.

ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี. 2537. วิธีการตรวจรักษาและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงในเด็ก. เชียงใหม่ : ภาควิชากุมารเวชศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์. หน้า 44-47.

ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, รัตน์ติกา แซ่ตั้ง, ชาญณรงค์ พิมพ์ศร, สุพัตรา ศิริโชติยะกุล และพิมลักษณ์ เจริญขวัญ. Application of an automated fluorescence D□A sequencing technique for analysis of b-thalassemia mutation. การประชุมวิชาการประจำปี สมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26. 14-17 มกราคม 2546, อาคารเฉลิมพระบารมี 50 ปี กรุงเทพมหานคร.

นลินอร นุ้ยปลอด. 2548. การวิเคราะห์บีตาธาลัสซีเมียที่ยังไม่ทราบชนิดการกลายพันธุ์ ณ หน่วยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลสงขลานครินทร์. สงขลา, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปราณี ฟู่เจริญ และสุทัศน์ ฟู่เจริญ. 2541. Detection of beta-thalassemia Mutations by Reverse Dot Blot Hybridization. ในธาลัสซีเมียการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR. หน้า 167-168.

ปราณี ฟู่เจริญ และสุทัศน์ ฟู่เจริญ. 2541. D□A Diagnosis in Thalassemia and Hemoglobinopathies. ในธาลัสซีเมียการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR. หน้า 38-41.

เพทาย เย็นจิตโสมนัส. 2544. อณูพยาธิวิทยา. ในธาลัสซีเมียสำหรับเวชปฏิบัติ. (จินตนา ศิรินาวิน, วันชัย วนะชิวนาวิน, วรวรรณ ตันไพจิตร และชนินทร์ ลิ่มวงศ์, บรรณาธิการ). กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน. หน้า 39.

วิชัย เหล่าสมบัติ. 2541. ธาลัสซีเมีย (Thalassemia). โอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์ กรุงเทพมหานคร.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ:ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟ-แอลพี. ภาควิชาพันธุศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณี เจตศรีสุภาพ. Thalassemia:Healthy Patients and Families. ภาควิชากุมารเวชศาสตร์, คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 1-5.

Baysal, E., Indrak, K., Bozkurt, G., Berkalp, A., Aritkan, E., Old, J.M., Ioannou, P., Angastiniotis, M., Droushiotou, A. and Yüregir, G.T. 1992. The beta-thalassaemia mutations in the population of Cyprus. Br J Haematol 81(4): 607-609.

Benito, A., Villegas, A., Perez-Cano, R. and Bernal, R. 1996. Beta-thalassaemia in south-western Spain: high frequency of G-->A (IVS I-1) mutation. Br J Haematol 92(2): 336-338.

Chan, V., Chan, T.K., Kan, Y.W. and Todd, D. 1988. A novel beta-thalassemia frameshift mutation (codon 14/15), detectable by direct visualization of abnormal restriction fragment in amplified genomic D□A. Blood 72(4): 1420-1423.

Charoenkwan, P., Sanguansermsri, T., Sirichotiyakul, S., Chaovaluksakul, S. and Sae-Tung, R. Beta-thalassemia major caused by beta-globin promotor mutations, hematological and molecular characterization. Oral presentation. 8th □ational Seminar in Thalassemia. Augustl 8-9, 2002, Khon Khan, Thailand.

Divoky, V., Bisse, E., Wilson, J.B., Gu, L.H., Wieland, H., Heinrichs, I., Prior, J.F. and Huisman, T.H. 1992. Heterozygosity for the IVS-I-5 (G-->C) mutation with a G-->A change at codon 18 (Val-->Met; Hb Baden) in cis and a T-->G mutation at codon 126 (Val-->Gly; Hb Dhonburi) in trans resulting in a thalassemia intermedia. Biochim Biophys Acta 1180(2): 173-179.

Fucharoen, G., Fuchareon, S., Jetsrisuparb, A. and Fukumaki, Y. 1991. Eight-base deletion in exon 3 of the beta-globin gene produced a novel variant (beta khon kaen) with an inclusion body beta-thalassemia trait. Blood 78(2): 537-539.

Fucharoen, G., Fucharoen, S., Jetsrisuparb, A. and Fukumaki, Y. 1990. Molecular basis of HbE-beta-thalassemia and the origin of HbE in northeast Thailand: identification of one novel mutation using amplified D□A from buffy coat specimens. Biochem Biophys Res Commun 170(2): 698-704.

Fucharoen, S. and Winichagoon, P. 1997. Hemoglobinopathies in Southeast Asia: molecular biology and clinical medicine. Hemoglobin 21(4): 299-319.

Fucharoen, S., Fucharoen, G., Ata, K., Aziz, S., Hashim, S., Hassan, K. and Fukumaki, Y. 1990. Molecular characterization and nonradioactive detection of beta- thalassemia in Malaysia. Acta Haematol 84(2): 82-88.

Fucharoen, S., Fucharoen, G., Fucharoen, P. and Fukumaki, Y. 1989. A novel ochre mutation in the beta-thalassemia gene of a Thai. Identification by direct cloning of the entire beta-globin gene amplified using polymerase chain reactions. J Biol Chem 264(14): 7780-7783.

Fukumaki, Y., Fucharoen, S., Fucharoen, G., Okamoto, □, Ichinose, M., Jetsrisuparb, A., Sriroongrueng, W., □opparatana, C., Laosombat, V. and Panich, V. 1992. Molecular heterogeneity of beta-thalassemia in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 23(2): 14-21.

Furuumi, H., Firdous, □, Inoue, T., Ohta, H., Winichagoon, P., Fucharoen, S. and Fukumaki, Y. 1998. Molecular basis of β-thalassemia in Maldives. Hemoglobin 22: 141-151.

Jankovic, L., Efremov, G.D., Josifovska, O., Juricic, D., Stoming, T.A., Kutlar, A. and Huisman, TH. 1990. An initiation codon mutation as a cause of a beta-thalassemia. Hemoglobin 14(2): 169-176.

Jankovic, L., Efremov, G.D., Petkov, G., Kattamis, C., George, E., Yang, K.G., Stoming, T.A. and Huisman, T.H. 1990. Two novel polyadenylation mutations leading to beta(+)-thalassemia. Br J Haematol 75(1): 122-126.

Koo, M.S., Kim, S.I., Cho, H.I., Hattori, Y., Yamashiro, Y., Hoshitani, M., Ohba, Y., Miyaji, T., Yamamoto, K. and Yamamoto, K. 1992. A beta-thalassemia mutation found in Korea. Hemoglobin 16(4): 313-320.

Lam, V.M., Xie, S.S., Tam, J.W., Woo, Y.K., Gu, Y.L. and Li, A.M. 1990. A new single nucleotide change at the initiation codon (ATG----AGG) identified in amplified genomic D□A of a Chinese beta-thalassemic patient. Blood 75(5): 1207-1208.

Laosombat, V. 1986. Thalassemia in children in Southern Thailand. J Med Assoc Thai 69: 393-399.

Laosombat, V., Fucharoen, S.P., Panich, V., Fucharoen, G., Wongchanchailert, M., Sriroongrueng, W., □opparatana, C., Kenpitak, K., Maipang, M. and Fukumaki, Y. 1992. Molecular basis of beta thalassemia in the south of Thailand. Am J Hematol 41(3): 194-198.

□opparatana, C., Panich, V., Saechan, V., Sriroongrueng, V., □opparatana, C., Rungjeadpha, J., Pornpatkul, M., Laosombat, V. and Fukumaki, Y. 1995. The spectrum of beta-thalassemia mutations in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 26(1): 229-234.

Oner, R., Altay, C., Gurgey, A., Aksoy, M., Kilinç, Y., Stoming, T.A., Reese, A.L., Kutlar, A., Kutlar, F. and Huisman, T.H. 1990. Beta-thalassemia in Turkey. Hemoglobin 14(1): 1-13.

Panich, V., Pornpatkul, M. and Sriroongrueng, W. 1992. The problem of thalassemia in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 23(2): 1-6.

Sirichotiyakul, S., Saetung, R. and Sanguansermsri, T. 2003. Analysis of beta-thalassemia mutations in northern Thailand using an automated fluorescence DNA sequencing technique. Hemoglobin 27(2): 89-95.

Sriroongrueng, W., Schleiemacher, E., Panich, V., Lopparatana, C., Saechan, V., Laosombat, V., Pornpatkul, M. and Fukumaki, Y. 1997. Analysis of beta-thalassemia mutations and beta-locus control region hypersensitive sites 2, 3 and 4 in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 28(3): 120-127.

Svasti, S., Hieu, T.M., Munkongdee, T., Winichagoon, P., Van, Be T., Van, Binh T. and Fucharoen, S. 2002. Molecular analysis of beta-thalassemia in South Vietnam. Am J Hematol 71(2): 85-88.

Takihara, Y., Nakamura, T., Yamada, H., Takagi, Y. and Fukumaki, Y. 1986. A novel mutation in the TATA box in a Japanese patient with beta^{+} thalassemia. Blood 67(2): 547-550.

Tamary, H., Surrey, S., Kirschmann, H., Shalmon, L., Zaizov, R., Schwartz, E. and Rappaport, E.F. 1994. Systematic use of automated fluorescence-based sequence analysis of amplified genomic DNA for rapid detection of point mutations. Am J Hematol 46(2): 127-133.

Thein, S.L., Winichagoon, P., Hesketh, C., Best, S., Fucharoen, S., Wasi, P., Weatherall, D.J. 1990. The molecular basis of beta-thalassemia in Thailand: application to prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 47(3): 369-375.

Tuzmen, S. and Schechter, A. 2001. Genetic diseases of hemoglobin : diagnostic methods for elucidating β-thalassemia mutations Blood Reviews 15: 19-29.

Vathana, , Viprakasit, V., Sanpakit, K., Chinchang, W., Veerakul, G. and Tanphaichitr, V. 2005. Clinical phenotypes and molecular diagnosis in a hitherto interaction of Hb E/beta thalassemia syndrome (beta(E)/beta(-31), (A -->G)). J Med Assoc Thai 88(8): 66-71.

Wildmann, C., Larondelle, Y., Vaerman, J.L., Eeckels, R., Martiat, P. and Philippe, M. 1993. An initiation codon mutation as a cause of beta-thalassemia in a Belgian family. Hemoglobin 17(1): 19-30.

Winichagoon, P., Fucharoen, S., Wilairat, P., Chihara, K., Fukumaki, Y. and Wasi, P. 1992. Identification of five rare mutations including a novel frameshift mutation causing beta zero-thalassemia in Thai patients with beta zero-thalassemia/hemoglobin E disease. Biochim Biophys Acta 1139(4): 280-286.

Winichagoon, P., Saechan, V., Sripanich, R., opparatana, C., Kanokpongsakdi, S., Maggio, A. and Fucharoen, S. 1999. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by reverse dot-blot hybridization. Prenat Diagn 19(5): 428-435.

Wong, C., Dowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.A. and Kazazian, HH Jr. 1987. Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy D A. ature 330(6146): 384-386.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

50X TAE

สารละลาย 1000 ml ประกอบด้วย:

Trisma base (MW 121.24)	242	g
Glycial acetic acid	57.1	ml
0.5 M EDTA pH 8	100	ml

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml แล้วนำไป autoclave

Blocking reagent

สารละลาย 200 ml ประกอบด้วย:

Blocking powder	2	g
Buffer I	200	ml

ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่ 80°C เป็นเวลา 40-50 นาที

0.3% Tween 20

สารละลาย 300 ml ประกอบด้วย:

Buffer I	200	ml
Tween 20	900	µl

Buffer I

สารละลาย 1000 ml ประกอบด้วย:

1 M Tris pH 7.5	100	ml
5 M NaCl (MW 58.44)	30	ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

Detection buffer

สารละลาย 1000 ml ประกอบด้วย:

1 M Tris pH 9.5	20	ml
5 M NaCl (MW 58.44)	4	ml
1 M $MgCl_2$	1	ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	200	ml

20X SSPE

สารละลาย 1000 ml ประกอบด้วย:

3.6 M NaCl (MW 58.44)	210	g
0.2 M $NaH_2PO_4.2H_2O$ (MW 156.01)	31.2	g
20 mM EDTA disodiam (MW 372.24)	7.4	g

ละลายด้วยน้ำกลั่น และวัด pH 7.4 ด้วย 10 M NaOH (ประมาณ 6.5 ml) เติมน้ำจนครบ 1000 ml แล้วนำไป autoclave

Washing buffer

สารละลาย 1000 ml ประกอบด้วย

20 SSPE	100	ml
10% SDS	10	ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml (ควรเติมน้ำก่อนเติม 10% SDS)

0% SDS

สารละลาย 200 ml ประกอบด้วย

sodium dodecyl sulfate (sodium lauryl sulfate)	20	g
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	200	ml

คนจนละลายหมด (ควรจะใช้ mask ปิดจมูก เพราะสารฟุ้งกระจายง่าย)

Hybridization buffer

สารละลาย 200 ml ประกอบด้วย

20 SSPE	30	ml
10% SDS	10	ml

M Tris pH 7.5

สารละลาย 1000 ml ประกอบด้วย

Tris	121.12	g

ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 7.5 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml แล้วนำไป autoclave

M Tris pH .5

สารละลาย 1000 ml ประกอบด้วย

Tris	121.12	g

ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 9.5 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml แล้วนำไป autoclave

0xPCR buffer

100 mM Tris, pH 8.3

500 mM KCl

15 mM $MgCl_2$

0.1% (w/v) grlatin หรือ 1% Triron -100

0.5 M sodium bicarbonate buffer

$NaHCO_3$ (MW 84.01) 4.2 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml

Na_2CO_3 (MW 106) 5.28 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml

วัด pH ของ $NaHCO_3$ และปรับให้ได้ pH 8.4 ด้วย 0.5 M Na_2CO_3

20x SSC

สารละลาย 1000 ml ประกอบด้วย

$NaCl_2$ (MW 58.44)	175.3	g
Trisodium citrate.$2H_2O$ (MW 294.10)	88.2	g
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

Hydridization duffer

สารละลาย 100 ml เตรียมโดย

20x SSC	10	ml
10% SDS	1	ml
ละลายในน้ำกลั่น	89	ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย dNTPs ซึ่งประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP อย่างละ 2 mM

- 25 mM stock solution : pipet 25 µl ของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดจาก stock 100 mM ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ -20 °C

- 2 mM working solution : ผสม 40 µl 25 mM stock solution ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 460 µl ให้เข้ากัน เก็บที่ -20°C

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล นางสาวพจนันท์ ทองจันทร์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220077

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปี พ.ศ. 2551

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการวิจัย 52-057-05-2-3

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Thongjan, P., Saechan, V., Nopparatana, C. Identification of uncharacterized β-thalassemia point mutations in Southern Thailand. 4th BUU Grad. Research Conference. March 13, 2009, Burupha University, Chonburi, Thailand. pp.62.

Thongjan, P., Saechan, V., Nopparatana, C. Rare point mutations of β-thalassemia in Southern Thailand. Proceeding of Faculty of Medicine 25th Prince of Songkhla University. August 5-7, 2009, Songkhla, Thailand.