



การระบุชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ด้วยวิธี Reverse Dot Blot Hybridization

Identification of  $\alpha$ -thalassemia 2 by Reverse Dot Blot Hybridization

เกศรา นิตยบูรณ์

Kesara Nittayaboon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Master of Science in Biomedical Sciences

Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



**การระบุชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ด้วยวิธี Reverse Dot Blot Hybridization**  
**Identification of  $\alpha$ -thalassemia 2 by Reverse Dot Blot Hybridization**

**เกศรา นิตยบูรณ์**

**Kesara Nittayaboon**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา**

**วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์**

**มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

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

**Master of Science in Biomedical Sciences**

**Prince of Songkla University**

**2558**

**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

ชื่อวิทยานิพนธ์	การระบุชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ด้วยวิธี Reverse Dot Blot Hybridization
ผู้เขียน	นางสาวเกศรา นิตยบุรณ์
สาขาวิชา	ชีวเวชศาสตร์

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จ่านงค์ นพรัตน์)

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

..... กรรมการ  
(ดร.วรรณรัตน์ แซ่ซุ่น)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จ่านงค์ นพรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตวิทยาลัย สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีระพล ศรีชนะ)

คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทน์ นพรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(นางสาวเกศรา นิตยบูรณ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน

และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวเกศรา นิตยบูรณ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การระบุชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ด้วยวิธี Reverse Dot Blot Hybridization
ผู้เขียน	นางสาวเกศรา นิตยบุรณ
สาขาวิชา	ชีวเวชศาสตร์
ปีการศึกษา	2558

### บทคัดย่อ

โรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) เป็นโรคแอลฟาธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงปานกลาง จะตรวจพบฮีโมโกลบินเอช (Hb H,  $\beta_4$ ) ในเลือดของผู้ป่วย โรคนี้เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งมีอุบัติการณ์ประมาณร้อยละ 7 และมีคู่สมรสที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคนี้ 26,000 คู่ต่อปี ทำให้เด็กเกิดใหม่มีโอกาสที่จะเป็นโรคนี้สูง การศึกษาในครั้งนี้เป็นการประยุกต์ใช้วิธี PCR และ reverse dot blot hybridization ตรวจหาความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบิน เพื่อช่วยในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช โดยใช้วิธี multiplex PCR เพิ่มปริมาณยีนของผู้ป่วย แล้วนำ PCR product มาทำปฏิกิริยา hybridization กับ allele specific oligonucleotide probe (ASO-probe hybridization) ซึ่งตั้งอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรน การทดลองในครั้งนี้ได้ตรวจชนิดของมิวเตชันทั้งหมด 8 ชนิด โดยแบ่งเป็นตรวจแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 2 ชนิด คือ ชนิด SEA และชนิด THAI และตรวจแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 จำนวน 6 ชนิด เป็นชนิด gene deletion จำนวน 2 ชนิด คือชนิด  $-\alpha^{3.7}$  และ  $-\alpha^{4.2}$  และชนิด point mutation จำนวน 4 ชนิด คือ ชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงส์ ( $\alpha^{CS}\alpha$ ) ฮีโมโกลบินปากเซ ( $\alpha^{PS}\alpha$ ) ฮีโมโกลบินกวางซี ( $\alpha^{QS}\alpha$ ) และฮีโมโกลบินสวนดอก ( $\alpha^{SD}\alpha$ ) โดยพบว่าผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชในภาคใต้ร้อยละ 78.02 มีมิวเตชันของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิด 3.7 kb deletion type I ซึ่งมีจีโนไทป์คือ  $-SEA / -\alpha^{3.7I}$  โดยแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ที่พบทั้งหมด คือ ชนิด SEA ส่วนแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 พบ 5 ชนิด คือ ชนิด  $-\alpha^{3.7I}$  ร้อยละ 65.97 ชนิด  $-\alpha^{3.7II}$  ร้อยละ 9.22 ชนิด  $-\alpha^{3.7III}$  ร้อยละ 2.83 ชนิด ฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงส์ ร้อยละ 21.27 และฮีโมโกลบินกวางซี ร้อยละ 0.71 จากการคำนวณค่าความไวและความจำเพาะของวิธี multiplex PCR และวิธี ASO-probe hybridization พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจประจำวันได้

**คำสำคัญ:** แอลฟาธาลัสซีเมีย โรคฮีโมโกลบินเอช ASO-probe hybridization และ reverse dot blot hybridization

<b>Thesis Title</b>	Identification of $\alpha$ -thalassemia 2 by Reverse Dot Blot Hybridization
<b>Author</b>	Miss Kesara Nittayaboon
<b>Major Program</b>	Biomedical Sciences
<b>Academic Year</b>	2015

### ABSTRACT

Hemoglobin H disease (Hb H disease) is an  $\alpha$ -thalassemia of intermediate severity, which Hb H ( $\beta_4$ ) is found in patient's blood. This disease is an important health problem in Thailand with the prevalence of 7 %. There are 26,000 couples at risk per year for having the children affected with the disease. Thus, the occasion of newborn with the Hb H disease stills high level. In this study, we applied the PCR and reverse dot blot (RDB) hybridization techniques to detect  $\alpha$ -globin gene mutation in Hb H patients. The multiplex PCR was used for amplifying the target DNA fragment and the RDB was used for identification the specific mutation in  $\alpha$ -globin gene by hybridized with allele specific oligonucleotide probes (ASO-probe hybridization) which were bound on the nylon membrane. Eight common  $\alpha$ -thalassemia mutations were detected including 2 types of  $\alpha$ -thalassemia1: SEA deletion type and THAI deletion type, and 6 types of  $\alpha$ -thalassemia2 which are 2 types of the deletion:  $-\alpha^{3.7}$  and  $-\alpha^{4.2}$ , and 4 types of point mutation: Hb Constant Spring ( $\alpha^{CS}\alpha$ ), Hb Paksé ( $\alpha^{PS}\alpha$ ), Hb Quong Sze ( $\alpha^{QS}\alpha$ ), and Hb Suan Dok ( $\alpha^{SD}\alpha$ ). We found that the major type of Hb H patients with percentage of 78.02 is a compound heterozygote of  $\alpha$ -thalassemia1 SEA type and  $\alpha$ -thalassemia2 3.7 kb deletion type I ( $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7 I}$  genotype). Five mutation types of  $\alpha$ -thalassemia2 were detected including  $-\alpha^{3.7 I}$  (65.97 %),  $-\alpha^{3.7 II}$  (9.22 %),  $-\alpha^{3.7 III}$  (2.83 %), Hb CS (21.27 %), and Hb QS (0.71 %). The multiplex PCR and RDB methods show high sensitivity and specificity and can be used for routine laboratory test.

**Keywords:**  $\alpha$ -thalassemia, Hb H disease, ASO-probe hybridization, and reverse dot blot hybridization

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จำนงค์ นพรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียและเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจโรคธาลัสซีเมีย ช่วยตรวจทาน แก้ไขข้อบกพร่อง และแนะนำการเขียนวิทยานิพนธ์ และบทความวิชาการ รวมถึงชี้แนะแนวทางในการศึกษาตลอดระยะเวลาการศึกษา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.อรุณรัศมี วณิชชานนท์ ประธานกรรมการสอบและ ดร.วรรณรัตน์ แซ่ซุ่น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ข้อเสนอแนะ และช่วยแนะนำแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคุณศรณ กาญจนโอภาส คุณกรทิพย์ อมรชาติ และคุณนิภาพร หมานหนู สำหรับความรู้ คำแนะนำในการใช้ห้องปฏิบัติการ การทำวิจัย และการอำนวยความสะดวกในการทำการวิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบพระคุณ หน่วยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย รวมถึงอำนวยความสะดวกด้านสารเคมี และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัย ที่ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากร ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความรู้ทั้งด้านวิชาการ และด้านอื่น ๆ อีกทั้งช่วยอำนวยความสะดวกในเรื่องเอกสารต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบพระคุณครอบครัว สำหรับโอกาสทางการศึกษา รวมถึงญาติพี่น้อง และเพื่อนๆ ที่คอยเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาการศึกษาจนประสบความสำเร็จในครั้งนี้

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนในการทำวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการวิจัย 57-005-04-6-2

เกศรา นิตยบุรณ์



## สารบัญ

รายการ	หน้า
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(11)
รายการไคอะแกรม	(14)
คำย่อและสัญลักษณ์	(16)
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	22
ผลการวิจัย	43
บทวิจารณ์ผลการวิจัย	60
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	67
บรรณานุกรม	68
ภาคผนวก	72
ประวัติผู้เขียน	76

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
<b>บทที่ 1</b>	
1. ลักษณะทางคลินิกของแอลฟาธาลัสซีเมีย จีโนไทป์ และชนิดของฮีโมโกลบินที่พบ	7
2. ชนิดมิวเตชันเฉพาะจุดแบบต่างๆ ที่พบในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้	12
3. ความถี่ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชเป็นร้อยละแยกตามชนิดและการกระจายตามภูมิภาคของประเทศไทย	14
4. อาการทางคลินิกที่พบในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช แยกตามชนิดของมิวเตชัน	15
5. เทคนิคทางอณูวิทยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ DNA สำหรับโรคธาลัสซีเมีย	17
<b>บทที่ 2</b>	
6. สารเคมีชนิดกรดนิวคลีอิกที่ใช้ในการทดลอง	22
7. เอนไซม์ที่ใช้สำหรับการทดลอง	23
8. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	23
9. วัสดุที่ใช้ในการทดลอง	24
10. ส่วนประกอบของ PCR mixture ในหลอดทดลองสำหรับเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีนแอลฟาโกลบินสำหรับการตรวจความผิดปกติของแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และมิวเตชันเฉพาะจุด	32
11. ส่วนประกอบของ PCR mixture ในหลอดทดลองสำหรับเพิ่มจำนวน DNA สำหรับตรวจความผิดปกติของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 3.7-kb deletion	34
12. ส่วนประกอบของ PCR mixture ในหลอดทดลองสำหรับเพิ่มจำนวน DNA สำหรับการตรวจความผิดปกติของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 4.2-kb deletion	35
<b>บทที่ 3</b>	
13. ผลการตรวจ Hb typing จากจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 141 ราย	43
14. ลำดับเบสและรายละเอียดคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	45

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
<b>บทที่ 3 (ต่อ)</b>	
15. ลำดับเบสและรายละเอียดของโพรบที่ใช้ในการตรวจมิวเตชันบนยีนแอลฟาโกลบิน	46
16. จำนวนของผู้ป่วยและร้อยละของมิวเตชันแต่ละชนิดที่พบในการทดลอง	58
 <b>บทที่ 4</b>	
17. เปรียบเทียบความถี่และชนิดของมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอชในประเทศไทย จากการศึกษาในครั้งนี้และการศึกษาของ Laosombat และคณะ	61
18. การเปรียบเทียบปริมาณ Hb และค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยของการกลายพันธุ์แต่ละชนิด	63
19. การเปรียบเทียบปริมาณฮีโมโกลบินเอช (%) ในเลือดของผู้ป่วยตั้งแต่อายุ 1 ปีขึ้นไป แยกตามชนิดของโรคฮีโมโกลบินเอช	65

## รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
<b>บทที่ 1</b>	
1. โครงสร้างของโมเลกุลฮีโมโกลบิน ซึ่งประกอบด้วยสายโกลบิน 4 สายจับอยู่กับฮีม (heme) สายละ 1 โมเลกุล	4
2. รูปA. แสดงตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการสร้างสายแอลฟาโกลบิน ( $\alpha$ -globin gene cluster) บนโครโมโซมคู่ที่ 16 และยีนที่ควบคุมการสร้างสายเบตาโกลบิน ( $\beta$ -globin gene cluster) บนโครโมโซมคู่ที่ 11	5
2. รูปB. แสดงการเรียงตัวของยีนบนโครโมโซมของยีนกลุ่มแอลฟาโกลบิน และเบตาโกลบิน	5
2. รูปC. แสดงยีนที่สร้างสายโกลบินในแต่ละระยะการเจริญของมนุษย์ ตั้งแต่ระยะตัวอ่อน ทารกและผู้ใหญ่	5
3. บริเวณที่เกิด gene deletion บนโครโมโซม 16 ที่เป็นสาเหตุของแอลฟาธาลัสซีเมีย1	9
4. กลไกการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของกลุ่มโครโมโซมบริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ทำให้มีการย้ายสลับที่ของดีเอ็นเอระหว่างโครโมโซม ทำให้เกิดโครโมโซมที่มี single $\alpha$ - gene ( $-\alpha^{3.7}$ หรือ $-\alpha^{4.2}$ ) และ triple $\alpha$ -gene ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$ หรือ $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$ )	10
5. ไคอะแกรมสรุปการทำปฏิกิริยา reverse dot bot hybridization	20
<b>บทที่ 2</b>	
6. ตำแหน่งไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา multiplex gap-PCR	25
7. ตำแหน่งของไพรเมอร์แต่ละชุดบน $\alpha$ -globin gene cluster	26
8. ตำแหน่งไพรเมอร์ A และ B ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีน - $\alpha^{3.7}$ สำหรับปฏิกิริยา PCR ครั้งแรก และไพรเมอร์ RT-L กับไพรเมอร์ B สำหรับปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 เพื่อใช้แยกชนิดย่อยของมิวเตชันของยีน - $\alpha^{3.7}$ ทั้ง 3 ชนิด	27

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
<b>บทที่ 3</b>	
9. ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของ DNA โดยการนำไปทดสอบใน 1% agarose gel electrophoresis	44
10A. PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีนแอลฟาโกลบินโดยใช้ไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์	48
10B. PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีนแอลฟาโกลบินโดยใช้ไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์	49
11A. PCR product จากไพรเมอร์คู่แรก (A และ B) ของการตรวจความผิดปกติของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 3.7 kb-deletion	50
11B. PCR product จากไพรเมอร์คู่ที่ 2 (RT-L และ Z) ของยีนแอลฟาโกลบินสำหรับ normal probe	51
11C. PCR product จากไพรเมอร์คู่ที่ 2 (RT-L และ B) ของยีนแอลฟาโกลบินสำหรับ mutant probe	52
12. PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA แอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 4.2 kb-deletion	53
13. ผล hybridization ของคนปกติ ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal	55
14. ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ชนิด -SEA/ $\alpha^{3.71}$ ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้นชุด probe ของ - $\alpha^{3.7}$ และพบจุดสีม่วงในแถว mutant คือ SEA และ ชุด - $\alpha^{3.7}$ ทั้ง 3 จุด	55
15. ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ชนิด -SEA/ $\alpha^{3.711}$ ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้นชุด probe ของ - $\alpha^{3.7}$ จำนวน 2 probe และพบจุดสีม่วงในแถว mutant คือ SEA และ ชุด - $\alpha^{3.7}$ จำนวน 2 จุดสุดท้าย	55

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
<b>บทที่ 3 (ต่อ)</b>	
16. ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ชนิด -SEA/ $\alpha^{3.7III}$ ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้นชุด probe ของ $-\alpha^{3.7}$ จำนวน 1 probe และพบจุดสีม่วงในแถว mutant คือ SEA และ ชุด $-\alpha^{3.7}$ จำนวน 1 probe ชุดท้าย	56
17. ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด -SEA/ $\alpha^{4.2}$ ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ในแถว normal เฉพาะ THAI และ SEA และพบจุดสีม่วงในแถว mutant เฉพาะ probe SEA และ $-\alpha^{4.2}$	56
18. ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด -SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$ ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้น probe CS PS และ $-\alpha^{4.2}$ สำหรับในแถว mutant พบจุดสีม่วงกับ probe SEA และ CS	56
19. ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด -SEA/ $\alpha^{OS}\alpha$ ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้น probe QS	57
20. ผล hybridization ของผู้ที่เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดยีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ชนิดย่อย 1 ( $\alpha\alpha/ -\alpha^{3.7 \text{ type 1}}$ ) ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal และ mutant probe ของ 3.7 ทั้ง 3 probes	57
21. ผล hybridization ของผู้ที่เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนต์-สปริง( $\alpha\alpha/ \alpha^{CS}\alpha$ ) ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal และ mutant probe ของคอนสแตนต์สปริง (CS)	57
<b>บทที่ 4</b>	
22. การเกิด gene deletion บริเวณ x box ของ $\alpha_2$ -globin gene ส่งผลให้เกิด $-\alpha^{3.7 I}$ , $-\alpha^{3.7 II}$ และ $-\alpha^{3.7 III}$	64

## รายการไดอะแกรม

ไดอะแกรมที่	หน้า
<b>บทที่ 2</b>	
1. แสดงตำแหน่งของ โพรบที่ตรึงลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน	36
2. แผนภูมิสรุปขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์หมีวเตชันแอลฟาธาลัสซีเมีย1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย2 จากตัวอย่างผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช	38
3. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลลบกับการตรวจ $\alpha$ -thal จะพบจุดสีม่วงเฉพาะบริเวณที่เป็น normal probe โดยผลลักษณะนี้พบในตัวอย่างของคนปกติ หรือตัวอย่างที่มีมิวเตชันชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากชนิดที่ตรวจวัดในครั้งนี	39
4. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น homozygote ของ mutation ชนิด SEA จะพบจุดสีม่วงเฉพาะกับ mutant probe ของ SEA และไม่พบจุดสีม่วงบน normal probe ชนิดอื่นๆ เนื่องจากยีนเกิดการขาดหายไปทั้ง 4 ยีน	39
5. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น heterozygote ของ mutation ชนิด SEA จะพบจุดสีม่วงทั้ง normal และ mutant probe ของ SEA ส่วน probes อื่นๆ จะพบจุดสีม่วงบริเวณ normal probe	39
6. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น compound heterozygote ของ $\alpha$ -thal1 ชนิด SEA ร่วมกับ $\alpha$ -thal2 ชนิด Constant's Spring จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ของ SEA และพบเฉพาะ mutant probe ของ CS บนเมมเบรน ส่วนมิวเตชัน ชนิด CS, PS, และ $-\alpha^{4.2}$ ใช้ normal probe ร่วมกัน จึงทำให้ไม่พบปฏิกิริยาบริเวณ normal probe ดังกล่าว	40
7. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น heterozygote ของ $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type I จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ทั้ง 3 จุด บนเมมเบรน	40
8. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น heterozygote ของ $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type II จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe 2 จุด บนเมมเบรน	40
9. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น heterozygote ของ $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type III จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe 1 จุด บนเมมเบรน	41
10. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น compound heterozygote ของ $\alpha$ -thal1 ชนิด SEA ร่วมกับ $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type I จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ของ โพรบ SEA และ mutant probe ของ 3.7 ทั้ง 3 จุด	41

## รายการไดอะแกรม (ต่อ)

ไดอะแกรมที่	หน้า
<b>บทที่ 2 (ต่อ)</b>	
11. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น compound heterozygote ของ $\alpha$ -thal1 ชนิด SEA ร่วมกับ $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type II จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ของ โพรบ SEA และ normal probe ของ 3.7 จำนวน 1 จุด mutant probe ของ 3.7 จำนวน 2 จุด	41
12. แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น compound heterozygote ของ $\alpha$ -thal1 ชนิด SEA ร่วมกับ $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type III จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ของ โพรบ SEA และ normal probe ของ 3.7 จำนวน 2 จุด mutant probe ของ 3.7 จำนวน 1 จุด	42



### คำย่อและสัญลักษณ์

Hb	=	hemoglobin
DNA	=	deoxyribonucleic acid
PCR	=	polymerase chain reaction
SEA	=	Southeast Asian type
MED	=	Mediterranean type
CS	=	Hb Constant Spring
PS	=	Hb Paksé
QS	=	Hb Quong Sze
SD	=	Hb Suan-Dok
MCV	=	mean corpuscular volume
MCH	=	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	=	mean corpuscular hemoglobin concentration
Hct	=	hematocrit
cd	=	codon
IVS	=	intervening sequence
Arg	=	Arginine
Asp	=	Aspartic acid
Gly	=	Glycine
His	=	Histidine
Leu	=	Leucine
Pro	=	Proline
Array CGH	=	Array comparative genomic hybridization
RDB	=	reverse dot blot hybridization
ARMS	=	amplification refractory mutation system
ASO-probe	=	allele-specific oligonucleotide probes

**คำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)**

dNTPS	=	deoxynucleotide triphosphate
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
pb	=	base pair
kb	=	kilobase pair
N	=	Normal
M	=	Mutant / molar
nM	=	nanomolar
mM	=	millimolar
pM	=	picomolar
l	=	liter
μl	=	microliter
ml	=	milliliter
g	=	gram
mg	=	milligram
nm	=	nanometer
OD	=	optical density
°C	=	degree Celsius

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia; thal) เป็นโรคโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมชนิดยีนด้อย (autosomal recessive inheritance) เกิดจากความผิดปกติของยีนที่สังเคราะห์สายโกลบิน (globin chains) ทำให้มีการผลิตฮีโมโกลบินลดลงหรือไม่สามารถผลิตได้เลย (Leung *et al.*, 2008) โรคธาลัสซีเมียที่สำคัญมี 2 ชนิด คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย ( $\alpha$ -thalassemia) และเบต้าธาลัสซีเมีย ( $\beta$ -thalassemia)

เบต้าธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติของยีนเบต้าโกลบิน ( $\beta$ -globin gene) โดยในคนปกติมียีนเบต้าโกลบิน 2 อัลลีล คือมียีน 1 อัลลีลจากโครโมโซมแต่ละข้าง จีโนมไทป์คือ  $\beta/\beta$  (Fuchareon, 2011) มีเวตซ์บนยีนเบต้าโกลบินที่ทำให้เกิดเบต้าธาลัสซีเมียในปัจจุบันพบได้ประมาณ 200 ชนิด (Thein and Wood *et al.*, 2009) ซึ่งส่วนมากเกิดจากมิวเตชันเฉพาะจุด (point mutation) เช่น การแทนที่เบส (base substitution) การแทรกหรือการหายไปของเบสจำนวน 1-4 เบส (small insertion or deletion) ทำให้การอ่านรหัสผิดปกติ ที่เรียกว่า frame shift mutation มีเบต้าธาลัสซีเมียส่วนน้อยที่เกิดจากการขาดหายไปของยีนขนาดใหญ่หรือทั้งยีน (large gene deletion) (Galanello and Origa, 2010)

แอลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบิน ( $\alpha$ -globin gene) โดยในคนปกติจะมียีนแอลฟาโกลบิน 4 อัลลีล คือมียีน 2 อัลลีล บนโครโมโซมแต่ละข้าง จีโนมไทป์คือ  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  (Fuchareon *et al.*, 2011) แอลฟาธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไปของยีนขนาดใหญ่ (large gene deletion) มีเพียงส่วนน้อยที่เกิดจากมิวเตชันเฉพาะจุด ที่สร้างโปรตีนโกลบินได้แต่เมื่อจับกันเป็นโมเลกุลฮีโมโกลบินส่วนใหญ่จะไม่เสถียร (Leung *et al.*, 2008)

อุบัติการณ์การเกิดธาลัสซีเมียพบว่าการกระจายของโรคอยู่บริเวณเขตร้อนและบริเวณข้างเคียงของเขตร้อนซึ่งเป็นบริเวณที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย ที่เรียกว่า malaria belt โดยเชื่อว่าพาหะของโรคธาลัสซีเมียสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ (Arica *et al.*, 2012) อุบัติการณ์ธาลัสซีเมียทั่วโลกประมาณร้อยละ 4.8 (Bernini *et al.*, 1998) ในบางพื้นที่ มีผู้ที่เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมียสูงถึงร้อยละ 80-90 ของกลุ่มประชากร (Harteveld and Higgs, 2010) เช่นใน Andhra Pradesh ในประเทศอินเดีย (Bernini *et al.*, 1998) อุบัติการณ์แอลฟาธาลัสซีเมียในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ทางตอนเหนือของประเทศไทยและประเทศลาว พบร้อยละ 30-40 ในประเทศมาเลเซียพบร้อยละ 4.5 และในหมู่เกาะห่างไกลของประเทศฟิลิปปินส์พบร้อยละ 5 ส่วนเบต้าธาลัสซีเมียมีความถี่อยู่ระหว่างร้อยละ

1-9 ทั่วโลกมีผู้ที่เป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมียประมาณร้อยละ 1.5 หรือ 80-90 ล้านคน (Galanello and Origa, 2010) ชนิดของธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย เบต้าธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี (Hb E) และฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงส์ (Hb Constant Spring) (Fuchareon *et al.*, 2011) สำหรับในประเทศไทย ข้อมูลจากศูนย์ข้อมูลธาลัสซีเมีย ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่า การกระจายของแอลฟาธาลัสซีเมียมีความชุกมากที่สุดใภาคเหนือ เท่ากับร้อยละ 30 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบร้อยละ 20 ภาคกลางพบร้อยละ 20-25 และภาคใต้พบ ร้อยละ 16 (Leung *et al.*, 2008) ความชุกของเบต้าธาลัสซีเมียมากที่สุดคือภาคเหนือ พบร้อยละ 5-9 ภาค อีสานพบร้อยละ 2-6 ภาคกลางพบร้อยละ 3 และภาคใต้พบร้อยละ 2-4 (Nopanitaya, 2008)

โรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) เป็นแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดหนึ่ง มีความรุนแรงของโรคปาน กลาง ซึ่งจะตรวจพบฮีโมโกลบินเอช (Hb H,  $\beta_2$ ) ในเลือดของผู้ป่วย โดยโรคฮีโมโกลบินเอชเกิดจาก ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาธาลัสซีเมีย1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย2 ทำให้เหลือยีนแอลฟาโกลบินเพียงยีน เดียวที่สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินได้ อาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคฮีโกลบินเอชมีความรุนแรง แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย2 โดยพบว่าผู้ป่วยที่มียีนแอลฟาธาลัสซีเมีย1 ร่วมกับ แอลฟาธาลัสซีเมีย2 ชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการขาดหายไปของยีน (non-deletional Hb H disease) มีความ รุนแรงของโรคมากกว่าผู้ป่วยที่มียีนแอลฟาธาลัสซีเมีย1 ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย2 ชนิดที่เกิดจากการ ขาดหายไปของยีน (deletional Hb H disease) (Chui *et al.*, 2003)

ข้อมูลจากศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวง สาธารณสุขพบว่า แต่ละปีในประเทศไทยมีหญิงตั้งครรภ์ที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็น โรคธาลัสซีเมีย ประมาณ 50,000 คน และมีเด็กเกิดใหม่ที่ป่วยเป็นโรคประมาณ 12,125 คน ในจำนวนนี้มีเด็กที่เป็น โรค ฮีโมโกลบินเอช 7,000 คน และคนไข้ฮีโมโกลบินเอชที่ยังมีชีวิตอยู่มีมากถึง 420,000 คน (Wasi *et al.*, 2013) ทำให้ธาลัสซีเมียเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งไม่เพียงแต่ส่งผลต่อตัวผู้ป่วย และครอบครัวเท่านั้น แต่ยังส่งผลต่อเศรษฐกิจอีกด้วย เนื่องจากค่ารักษาในการให้เลือดแต่ละครั้งสูง อีก ทั้งเป็นโรคที่รักษาไม่หาย ในปัจจุบันมีรายงานถึงชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมียที่พบในประเทศไทยมี ความหลากหลาย ทำให้ไม่มีการทดสอบใดการทดสอบหนึ่งในห้องปฏิบัติการที่สามารถตรวจชนิดของ แอลฟาธาลัสซีเมียได้ครอบคลุมทุกชนิด การพัฒนาวิธีทดสอบที่สามารถตรวจชนิดมิวเตชันได้ ครอบคลุมทั้งหมดจึงมีความสำคัญในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรค รวมถึงเฝ้าระวังในผู้ป่วยที่มี โอกาสเกิดเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันได้

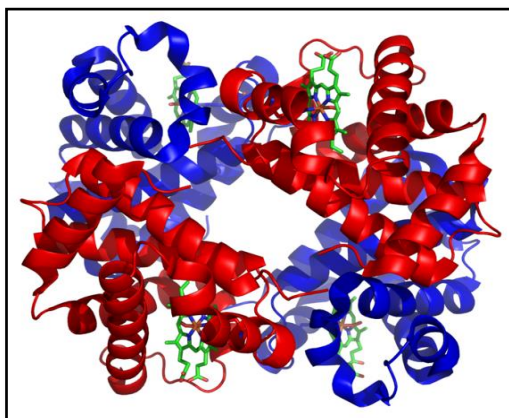
การตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียสามารถทำได้หลายขั้นตอน เช่น การตรวจคัดกรอง (screening test) การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน (Hb typing) และการตรวจวิเคราะห์ DNA ซึ่งการ ตรวจคัดกรอง และการวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินไม่สามารถระบุชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมียได้

การตรวจวิเคราะห์ DNA จึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด มีความแม่นยำ และทำให้ทราบชนิดมิวเตชันได้ ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคนี้เพื่อการพยากรณ์โรคและวางแผนการรักษา โดยทั่วไปการตรวจหาฮีนแอลฟาธาลัสซีเมียจะใช้วิธี gap-PCR (gap-polymerase chain reaction) ซึ่งสามารถทำได้โดยการสังเคราะห์ DNA คร่อมรอยต่อบริเวณที่ DNA ขาดหายไป แล้วตรวจผลโดยการนำ PCR product ไปวิ่งในเจลอะกาโรส ส่วนแอลฟาธาลัสซีเมียที่ไม่ได้เกิดการขาดหายไปของยีนจะใช้วิธี allele-specific PCR เพื่อสังเคราะห์ฮีนที่จำเพาะกับไพรเมอร์แต่ละชนิด การศึกษาในครั้งนี้ เลือกใช้วิธี reverse dot blot hybridization หรือ RDB ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาชนิดมิวเตชันของยีนได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว (Old, 2003) โดยมีหลักการคือ สร้างโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ (oligonucleotide probes) ที่จำเพาะต่อมิวเตชันแต่ละชนิด นำมาตรึงบนแผ่นไนลอน (nylon membrane) แล้วนำ PCR product ของผู้ป่วยที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) มาทำปฏิกิริยาเข้าคู่ (hybridized) กับโพรบ แล้วตรวจวัดผลด้วยการดูสีจากปฏิกิริยาของเอนไซม์และสารตั้งต้น (Winichagoon *et al.*, 1998) ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์และสามารถใช้ระบุชนิดมิวเตชันของโรคฮีโมโกลบินเอชชนิดที่ซับซ้อนได้ (Lin *et al.*, 2012)

## 1.2 การตรวจเอกสาร

### 1.2.1. ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin, Hb)

ฮีโมโกลบิน เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่นำออกซิเจนไปสู่เซลล์และเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆภายในร่างกาย ในแต่ละอนุของฮีโมโกลบิน ประกอบด้วยฮีม (heme) และสายโกลบิน (globin chain) 2 ชนิด คือ ชนิดที่อยู่ในกลุ่มแอลฟา ( $\alpha$ -like globin chain) และชนิดที่อยู่ในกลุ่มเบต้า ( $\beta$ -like globin chain) ชนิดละ 2 สาย จับกันเป็นฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุล ที่เรียกว่า tetramer (Higgs *et al.*, 2009) และแต่ละสายโกลบินจะจับอยู่กับฮีม 1 โมเลกุล ซึ่งฮีม 1 โมเลกุล จะสามารถจับกับออกซิเจนได้ 1 โมเลกุล ทำให้ฮีโมโกลบิน 1 อนุสามารถจับกับออกซิเจนได้ 4 โมเลกุล โครงสร้างของฮีโมโกลบินแสดงในรูปที่ 1



**รูปที่ 1** โครงสร้างของโมเลกุลฮีโมโกลบิน ซึ่งประกอบด้วยสายโกลบิน 4 สายจับอยู่กับฮีม (heme) สายละ 1 โมเลกุล (Paoli *et al.*, 1992)

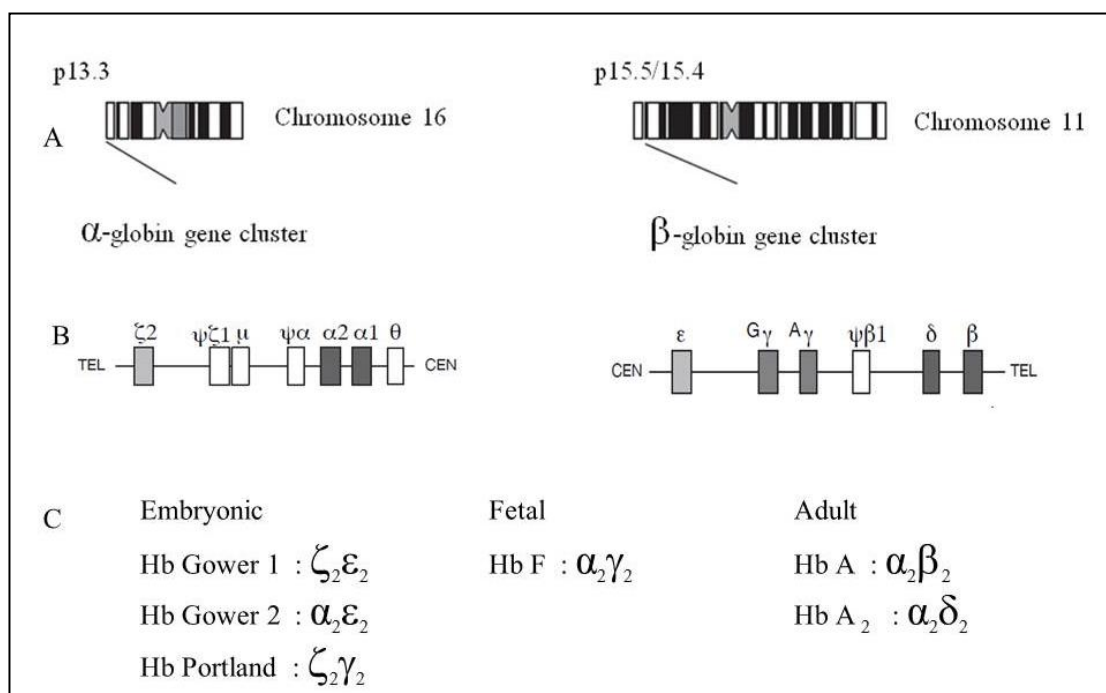
### 1.2.2 ยีนโกลบิน (globin gene)

ฮีโมโกลบินที่สร้างขึ้นในร่างกาย ถูกควบคุมโดยยีน ซึ่งยีนที่ควบคุมการสร้างสายโพรตีนโกลบิน ได้แก่

1.2.2.1 ยีนกลุ่มแอลฟาโกลบิน ( $\alpha$ -globin gene cluster) ตั้งอยู่บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 16 ตำแหน่ง 16p13.3 ประกอบด้วยสาย DNA ขนาด 25 กิโลเบส ซึ่งบริเวณนี้มีส่วนประกอบของเบส CG สูง คือมีสัดส่วนร้อยละ 60 มีบริเวณ CpG islands และมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Alu* (*Alu* repeats) หลายตำแหน่ง ยีนมีการเรียงลำดับกันคือ telomere- $\zeta$ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\theta$ -centromere โดยมียีนที่สามารถแปลรหัสเป็นโพรตีนได้ ได้แก่ ยีน  $\zeta$  (zeta) สร้างสายซิตาโกลบินในระยะทารก เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน Gower I และ Portland ซึ่งเป็น embryonic Hb ยีน  $\alpha_2$  (alpha2) และ  $\alpha_1$  (alpha1) สร้างสายแอลฟาโกลบิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอ (HbA) และฮีโมโกลบินเอ2 (Hb A<sub>2</sub>) ในวัยผู้ใหญ่ คนปกติมียีนแอลฟาโกลบินทั้งหมด 4 ยีน คือมียีนแอลฟาโกลบิน 2 ตำแหน่งบนแต่ละโครโมโซม

1.2.2.2 ยีนกลุ่มเบต้าโกลบิน ( $\beta$ -globin gene cluster) ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 ตำแหน่ง 11p15.5 ประกอบด้วย DNA ขนาด 50 กิโลเบส ซึ่งบริเวณนี้มีอัตราส่วนของเบส AT สูง และไม่มี CpG islands ยีนมีการเรียงลำดับกันคือ telomere- $\beta$ - $\delta$ - $\psi\beta$ - $\gamma$ - $\gamma$ - $\epsilon$ -centromere โดยมียีนที่สามารถแปลรหัสเป็นโพรตีนได้แก่ยีน  $\epsilon$  (epsilon) ยีน  $\gamma$  (gamma G) และ  $\gamma$  (gamma A) สร้างสายแกมมาโกลบินซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน Portland และ Hb F ยีน  $\beta$  (beta) สร้างสายเบต้าโกลบินซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอ (Hb A)

ในระยะผู้ใหญ่ โดยในคนปกติมียีนเบต้าโกลบิน 1 ยีน บนแต่ละโครโมโซม และยีน  $\delta$  (delta) สร้างสายเคดต้าโกลบินซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอ2 (Hb A<sub>2</sub>) ดังแสดงในรูปที่ 2



**รูปที่ 2** รูป A แสดงตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการสร้างสายแอลฟาโกลบิน ( $\alpha$ -globin gene cluster) บนโครโมโซมคู่ที่ 16 และยีนที่ควบคุมการสร้างสายเบต้าโกลบิน ( $\beta$ -globin gene cluster) บนโครโมโซมคู่ที่ 11

รูป B แสดงการเรียงตัวของยีนบนโครโมโซมของยีนกลุ่มแอลฟาโกลบินและเบต้าโกลบิน

รูป C แสดงยีนที่สร้างสายโกลบินในแต่ละระยะการเจริญของมนุษย์ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนทารก และผู้ใหญ่ (คัดแปลงจาก Higgs *et al.*, 2009)

### 1.2.3 ธาลัสซีเมีย (Thalassemia)

ธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่มีปริมาณลดลง ซึ่งเกิดจากยีนที่ไม่สามารถสังเคราะห์สายโกลบินได้ หรือสังเคราะห์ได้ลดลง และเกิดภาวะไม่สมดุลของการสังเคราะห์สายโกลบินแต่ละชนิด (imbalanced globin synthesis) ทำให้เม็ดเลือดแดงมีลักษณะผิดปกติและแตกง่าย ผู้ป่วยจะมีอาการซีดเรื้อรัง เหลือง ตับและม้ามโต และมีการเปลี่ยนแปลงของกระดูก

ฮีโมโกลบินหลักตั้งแต่วัยเด็กถึงวัยผู้ใหญ่ คือฮีโมโกลบินเอ (Hb A) ซึ่งประกอบด้วยสายแอลฟาโกลบินจับอยู่กับสายเบต้าโกลบิน ดังนั้นธาลัสซีเมียจึงแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ตามชนิดของยีนที่สร้างสายโกลบิน คือ เบต้าธาลัสซีเมีย และ แอลฟาธาลัสซีเมีย

1.2.3.1 เบต้าธาลัสซีเมีย ( $\beta$ -thalassemia) เกิดจากความบกพร่องในการสังเคราะห์สาย  $\beta$ -globin พบได้บ่อยและมีอาการรุนแรง โดยอาจเกิดจาก base substitution หรือ deletion หรือ insertion ภายในบริเวณต่างๆบนยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สาย  $\beta$ -globin ทำให้มีการสร้างสาย  $\beta$ -globin ลดลง ( $\beta^+$ -thalassemia) หรือไม่สามารถสร้างได้ ( $\beta^0$ -thalassemia) และเกิดพยาธิสภาพทั้งจากความไม่สมบูรณ์ของฮีโมโกลบินที่สร้างขึ้น หรือจากสายโปรตีนโกลบินที่ไม่สมดุล เช่น เกิดจากสายแอลฟาโกลบินที่เป็นอิสระ (unmatched  $\alpha$ -globin) ตกตะกอนในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดง

1.2.3.2 แอลฟาธาลัสซีเมีย ( $\alpha$ -thalassemia) เกิดจากความบกพร่องในการสังเคราะห์สาย  $\alpha$ -globin เป็นชนิดที่พบบ่อยกว่า แต่ไม่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากชนิดที่เป็น homozygote จะเสียชีวิตทั้งหมด ตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือหลังคลอดไม่นาน เรียกว่าโรค Hemoglobin Bart's hydrop fetalis ส่วนชนิด heterozygote จะไม่มีอาการ พยาธิสภาพที่เกิดจากแอลฟาธาลัสซีเมียตั้งแต่วัยเด็กจนถึงวัยผู้ใหญ่ คือ โรคฮีโมโกลบินเอช ซึ่งเกิดจากสาย  $\beta$ -globin จับกันเองเป็น  $\beta_4$  (Hb H) เป็นโมเลกุลฮีโมโกลบิน (tetramer) ที่มีความสามารถในการละลายได้ดีกว่าและมีความเป็นพิษน้อยกว่าตะกอนที่เกิดจาก free  $\alpha$ -globin chain ใน  $\beta$ -thalassemia ทำให้ธาลัสซีเมียชนิดแอลฟามีความรุนแรงน้อยกว่าชนิดเบต้า (Higgs *et al.*, 2009)

#### 1.2.3.2.1 ชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย

ในคนปกติ จะมียีนแอลฟาโกลบิน 2 ยีน ในแต่ละข้างของโครโมโซม ( $\alpha\alpha$ ) เพราะฉะนั้นในแต่ละคนจะมียีนแอลฟาทั้งหมด 4 ยีน ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) การขาดหายไปของยีน (gene deletion) หรือ มีมิวเตชันที่ทำให้ยีนแอลฟา 1 ยีน หรือหลายยีนไม่สามารถทำงานได้ ทำให้เกิดแอลฟาธาลัสซีเมียได้หลายชนิด ได้แก่

1) แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ( $\alpha^-$ -thalassemia2) หรือ แอลฟาเบวธาลัสซีเมีย ( $\alpha^+$ -thalassemia) เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน 1 ยีน ทำให้มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินได้ลดลง หรือมีมิวเตชันแบบ point mutation ทำให้มีการสร้างเส้นโปรตีนที่ไม่เสถียรขึ้น ผู้ที่เป็นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ( $\alpha^-$ -thalassemia 2 trait,  $\alpha/\alpha$ ) จะไม่มีภาวะโลหิตจาง และไม่มีอาการทางคลินิก

2) แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ( $\alpha^0$ -thalassemia1) หรือ แอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมีย ( $\alpha^0$ -thalassemia) เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน 2 ยีน บนโครโมโซมข้าง



เดียวกัน ทำให้ไม่มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินจากโครโมโซมข้างนั้น ๆ ผู้ที่เป็นพาหะ ( $--/\alpha\alpha$ ) จะมีภาวะโลหิตจางเล็กน้อย เม็ดเลือดแดงจะมีขนาดเล็กกว่าปกติ คือ ในผู้ใหญ่จะมี  $MCV < 80$  fL

3) โรคฮีโมโกลบินเอช (Hemoglobin H disease) เป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมที่เป็นแอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>1</sup> และแอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>2</sup> ทำให้เหลือฮีนแอลฟาโกลบินเพียง 1 ยีน ( $--/\alpha$  หรือ  $--/\alpha^T\alpha$ ) ที่สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินที่ปกติได้ ผู้ป่วยมีอาการซีดเล็กน้อยถึงปานกลาง เมื่อตรวจเลือดพบว่าค่าฮีโมโกลบิน (Hb) และฮีมาโตคริต (Hct) ต่ำกว่าค่าปกติ และพบ Hb H ( $\beta_4$ ) ในผู้ใหญ่ ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการซีดรุนแรง ต้องรับเลือดเป็นประจำ และอาจมีตับและม้ามโตได้ ซึ่งอาการจะคล้ายกับโรคเบต้าธาลัสซีเมีย

4) โรคทารกบวมน้ำชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท (Hemoglobin Bart's hydrops fetalis หรือ homozygous  $\alpha$ -thalassemia1) มีจีโนไทป์เป็น  $--/--$  เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดที่รุนแรงที่สุด ทารกจะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา หรือตายทันทีหลังคลอด ปัญหาที่พบในแม่ระหว่างตั้งครรภ์คือ ครรภ์เป็นพิษ ความดันโลหิตสูง บวม การคลอดผิดปกติ และตกเลือดภายหลังการคลอดซึ่งอาจทำให้เสียชีวิตได้ (Fuchareon and Winichagoon, 2002)

ลักษณะทางคลินิก จีโนไทป์และชนิดของฮีโมโกลบินที่พบในแอลฟาธาลัสซีเมียแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางคลินิกของแอลฟาธาลัสซีเมีย จีโนไทป์ และชนิดของฮีโมโกลบินที่พบ

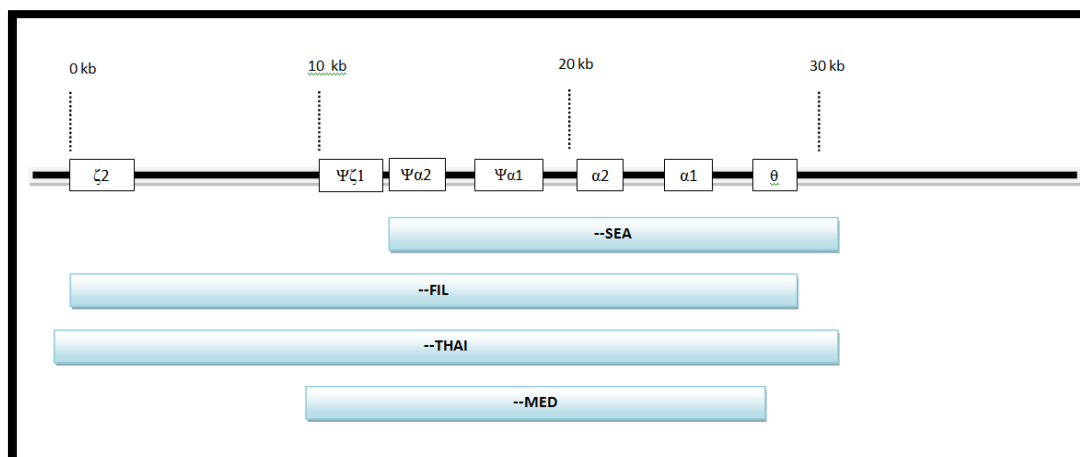
ภาวะหรือโรค	จีโนไทป์	ลักษณะทางคลินิก	ชนิดของ Hb ที่พบ
1. $\alpha$ – thalassemia1 trait	$--/\alpha\alpha$	ไม่แสดงอาการ มีโลหิตจางเล็กน้อย	$A_2$ , A
2. $\alpha$ – thalassemia2 trait	$-\alpha/\alpha\alpha$	ไม่แสดงอาการ ไม่มีโลหิตจาง	$A_2$ , A
3. Homozygus $\alpha$ – thalassemia 2	$-\alpha/-\alpha$	ไม่แสดงอาการ โลหิตจางเล็กน้อย	$A_2$ , A
4. Hemoglobin H disease	$--/-\alpha$ หรือ $--/\alpha^T\alpha$	ซีดเล็กน้อยถึงปานกลาง แต่ถ้ามีไข้จะมีภาวะซีดอย่างรวดเร็ว ทำให้มีอาการทางสมอง และหัวใจวายได้	$A_2$ , A, H , Bart's หรือ CS
5. Hemoglobin Bart's hydrops fetalis	$--/--$	เสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์ หรือหลังคลอดได้ไม่นาน	Bart's , Portland

### 1.2.3.2.2 กลไกการเกิดแอลฟาธาลัสซีเมีย

ความผิดปกติของยีนที่ทำให้เกิดแอลฟาธาลัสซีเมียซึ่งส่งผลให้มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินลดลง ส่วนใหญ่เกิดจาก gene deletion เรียกว่า deletion  $\alpha$ -thalassemia ซึ่งความรุนแรงของแอลฟาธาลัสซีเมีย ขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA และจำนวนยีนที่เกิด deletion มีแอลฟาธาลัสซีเมียเพียงส่วนน้อยที่เกิดจากความผิดปกติด้าน โครงสร้างของยีนโดยที่ยีนยังคงอยู่เรียกว่า non-deletion  $\alpha$ -thalassemia

#### 1.2.3.2.2.1 แอลฟาธาลัสซีเมียที่เกิดจาก gene deletion (gene deletion $\alpha$ -thalassemia)

**แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ( $\alpha$ -thalassemia 1)** เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน ทั้ง 2 ยีน คือทั้ง  $\alpha_1$  และ  $\alpha_2$  บนโครโมโซมข้างเดียวกัน (--) ทำให้ไม่มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินจากโครโมโซมข้างนั้น ขนาดของดีเอ็นเอที่ขาดหายไป อาจครอบคลุมเฉพาะบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน หรือ อาจเลยไปถึงยีนซีต้าโกลบิน ( $\zeta$ -globin gene) สำหรับแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ที่พบในประเทศไทย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ชนิด Southeast Asian type (--<sup>SEA</sup>) เกิดจากการขาดหายไปของเบสตั้งแต่บริเวณ  $\psi\zeta$ -globin gene ไปจนถึงบริเวณของยีนแอลฟาโกลบินทั้งสอง ขนาด 19.3 กิโลเบส ส่วนชนิดที่พบบ่อยในประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (--<sup>MED</sup>) เกิดจาก gene deletion ขนาด 18 กิโลเบส และชนิดที่พบได้ไม่บ่อยในประเทศไทย คือ ชนิดไทย (--<sup>THAI</sup>) ซึ่งเกิดจาก gene deletion ขนาด 33.45 กิโลเบส (Winichagoon *et al.*, 1998) บริเวณที่เกิด deletion แสดงในไดอะแกรมรูปที่ 3



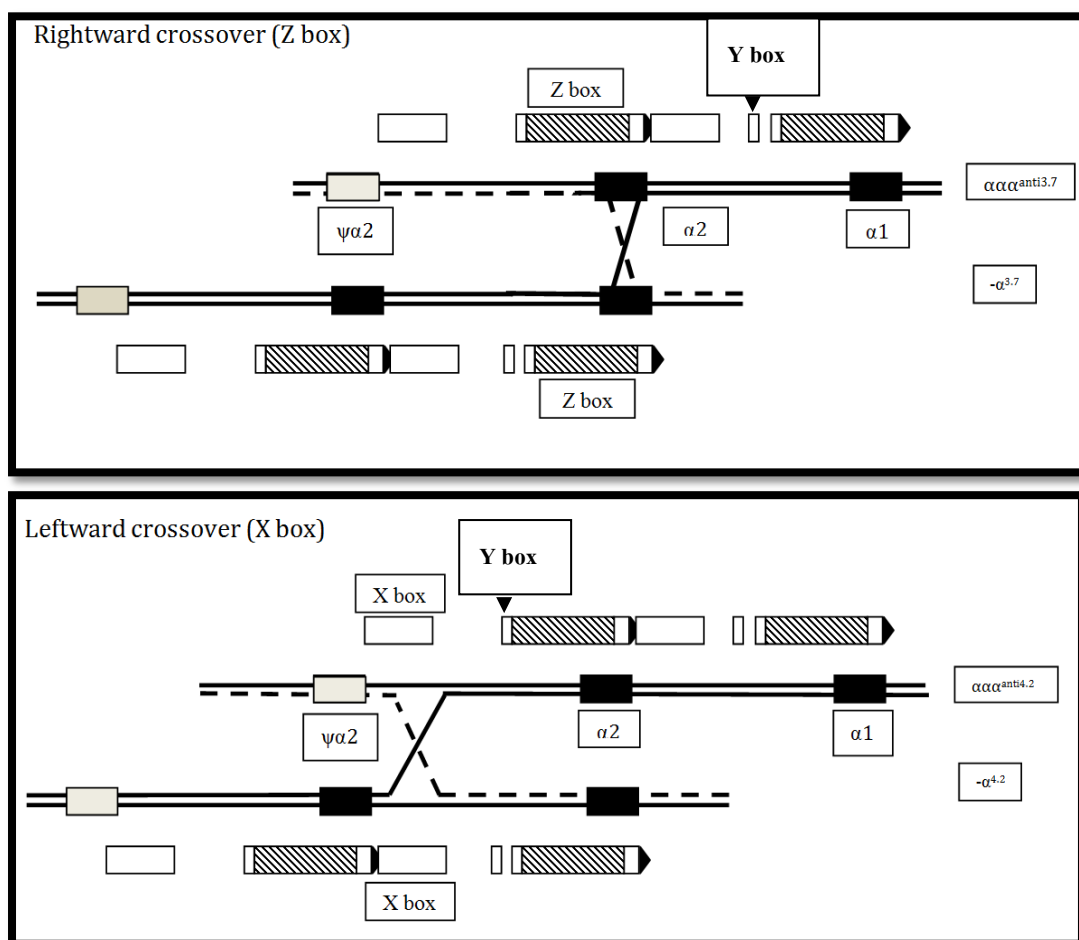
รูปที่ 3 บริเวณที่เกิด gene deletion บนโครโมโซม 16 ที่เป็นสาเหตุของแอลฟาธาลัสซีเมีย

แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ( $\alpha$ -thalassemia2) เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินเพียง 1 ยีนบนโครโมโซมข้างหนึ่ง ทำให้บนโครโมโซมข้างนั้น มียีนแอลฟาโกลบินเหลือ 1 ยีน ( $-\alpha$ ) ที่สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินได้ แต่มีปริมาณลดน้อยลงกว่าปกติ ซึ่งความรุนแรงของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 จะน้อยกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1

แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ยังแบ่งเป็น 2 ชนิด ตามตำแหน่ง และขนาดของ DNA ที่ ขาดหายไป

1) Rightward deletion type เกิดจากการที่ DNA บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน  $\alpha_2$  และ  $\alpha_1$  เกิด gene deletion ขนาด 3.7 กิโลเบส จีโนไทป์ คือ  $-\alpha^{3.7}$  และ DNA ส่วนที่เหลือของยีน  $\alpha_2$  และ  $\alpha_1$  มาเชื่อมต่อกัน กลายเป็น hybrid gene โครโมโซมข้างนั้นจึงยังมีแอลฟาโกลบินยีนเหลืออยู่ ซึ่งสามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินได้ กลไกที่ทำให้เกิดการขาดหายไปของยีนเกิดจาก unequal crossing over บริเวณ z box (รูปที่ 4) ซึ่ง hybrid gene ที่พบมี 3 ชนิด คือ 3.7-kb deletion type I ( $-\alpha^{3.7 I}$ ), 3.7-kb deletion type II ( $-\alpha^{3.7 II}$ ), และ 3.7-kb deletion type III ( $-\alpha^{3.7 III}$ )

2) Leftward deletion type เกิดจากการขาดหายไปของ DNA บริเวณ  $\alpha_2$  ขนาด 4.2 กิโลเบส จีโนไทป์คือ  $-\alpha^{4.2}$  จึงเหลือยีนแอลฟาเพียง 1 ยีนที่สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินได้ ซึ่งกลไกที่ทำให้เกิดการขาดหายไปของยีนเกิดจาก unequal crossing over บริเวณ x box (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 กลไกการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของคูโครโมโซมบริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ทำให้มีการย้ายสลับที่ของดีเอ็นเอระหว่างโครโมโซม ทำให้เกิดโครโมโซมที่มี single  $\alpha$ -globin gene ( $-\alpha^{3.7}$  หรือ  $-\alpha^{4.2}$ ) และ triple  $\alpha$ -globin gene ( $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$  หรือ  $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ )

x, y และ z boxes คือบริเวณที่มีลำดับของดีเอ็นเอเหมือนกัน (homology sequence) ซึ่งพบบริเวณขึ้น  $\alpha_2$  และ  $\alpha_1$  (Higgs *et al.*, 2009)

#### 1.2.3.2.2.2 แอลฟาธาลัสซีเมียที่ไม่ได้เกิดจาก gene deletion (non-deletion $\alpha$ -thalassemia)

ธาลัสซีเมียบางชนิด ตรวจไม่พบการขาดหายไปของยีน แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส ซึ่งอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงเบสเพียง 1 เบส (point mutation) เช่นการแทนที่เบส (single-nucleotide substitution) หรืออาจมีการ

เพิ่มขึ้นหรือหายไปของเบสเป็นจำนวนน้อย (small deletion or insertion) ทำให้เกิดการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนผิดพลาด โดยเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแล้ว ทำให้มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินได้ลดลงหรือสร้างได้ปกติแต่สายโกลบินไม่เสถียรซึ่งส่วนใหญ่จะพบความผิดปกติบนยีน  $\alpha_2$  ความผิดปกติบนยีน  $\alpha_2$  ทำให้เกิดความผิดปกติในระดับฟีโนไทป์ (phenotype) ได้มากกว่าบนยีน  $\alpha_1$  เนื่องจากยีน  $\alpha_2$  มีการแสดงออกมากกว่ายีน  $\alpha_1$  ประมาณ 2-3 เท่า (Fuchareon and Winichagoon, 2011)

ข้อมูลในตารางที่ 2 แสดงชนิดมิวเตชันเฉพาะจุดแบบต่างๆ ที่พบใน ประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ตารางที่ 2 ชนิดมิวเตชันเฉพาะจุดแบบต่างๆ ที่พบในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คัดแปลงจาก *Baillière's Clinical Haematology* (Bernini *et al.*,1998) และ *Disorders of Hemoglobin* (Higgs *et al.* 2009))

Mutant class	Origin	Phenotype	Reference
<b>(1) RNA- processing mutants</b> - <i>Splice site mutations</i>			
$\alpha_1$ IVS1 1 donor (AGGT ->AGAT)	Thai	$\alpha^+$	Hartveld <i>et al.</i> ,1998
<b>(2) RNA-translation mutants</b> <i>(A) Initiation codon mutations</i>			
$\alpha_2$ (ATG-> -TG)	Vietnamese	$\alpha^+$	Waye <i>et al.</i> ,1996
$\alpha_2$ (ATG-> A-G)	Southeast Asian	$\alpha^+$	Waye <i>et al.</i> ,1996
<i>(B) Termination codon mutations</i>			
$\alpha_2$ cd 142 (TAA -> CAA) Hb Constant Spring	Southeast Asian	$\alpha^+$	Clegg <i>et al.</i> ,1971
$\alpha_2$ cd 142 (TAA -> TAT) Hb Paksé	Laotian	$\alpha^+$	Bradley <i>et al.</i> ,1975
<b>(3) Mutants causing post-translational instability</b> <i>(A) Unstable <math>\alpha</math> chain variants due to point mutations</i>			
$\alpha_2$ cd 59 GGC -> GAC (Gly -> Asp)	Southeast Asian	$\alpha^+$	Chan <i>et al.</i> ,1997
$\alpha_1$ cd 74 GAC ->CAC (Asp -> His) Hb Q-Thailand	Thai	$\alpha^+$	Vella <i>et al.</i> ,1958
$\alpha_2$ cd 125 CTG -> CCG (Leu -> Pro) Hb Quong Sze	Southeast Asian	$\alpha^+$	Goossens <i>et al.</i> ,1982
$\alpha_2$ cd 109 CTG -> CGG (Leu -> Arg) Hb Suan Dok	Southeast Asian	$\alpha^+$	Sanguansermisri <i>et al.</i> , 1979
<i>(B) Unstable <math>\alpha</math> chain variants due to small deletions</i>			
$\alpha_2$ cd 30 (-GAG, Glu)	Southeast Asian	$\alpha^+$	Chan <i>et al.</i> ,1997

*cd* =codon, *IVS* =intervening sequence, *Gly* =Glycine, *His* =Histidine, *Asp* =Aspartic acid,  
*Leu* =Leucine, *Pro* =Proline, *Arg* =Arginine

### 1.2.4 โรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease)

โรคฮีโมโกลบินเอช เป็นโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดหนึ่ง เกิดจากปฏิสัมพันธ์ของ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ซึ่งความรุนแรงของโรคจะขึ้นอยู่กับชนิดของ แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 มีความรุนแรงของโรคปานกลาง ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะสามารถผลิตสาย แอลฟาโกลบินได้เพียงร้อยละ 30 อาการทางคลินิกของโรคฮีโมโกลบินเอชได้แก่ ซีด ค่า ฮีโมโกลบินเฉลี่ยอยู่ที่ 9 g/dL ตรวจพบฮีโมโกลบินเอช ( $\beta_4$ ) ในเลือด บางรายอาจมีภาวะตับ และม้ามโต พบก้อนนิ่ว และมีโอกาสพบภาวะแทรกซ้อนเมื่อผู้ป่วยได้รับยาบางชนิดที่มีฤทธิ์ oxidant ซึ่งการตกตะกอนของฮีโมโกลบินเอชจะทำให้เม็ดเลือดแดงขาดความยืดหยุ่น และถูก กำจัดออกโดยม้าม

แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 แบ่งเป็น 2 ชนิด คือชนิดที่เกิดจากการขาดหายไปของยีน และชนิด ที่ไม่ได้เกิดจากการขาดหายไปของยีน ทำให้โรคฮีโมโกลบินเอชแบ่งได้ 2 ชนิด คือ

1) Deletional Hb H disease คือ โรคฮีโมโกลบินเอชชนิดที่เกิดจากการขาดหายไปของ ยีน ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการไม่รุนแรง อาจมีอาการตาเหลืองเล็กน้อย (mild icteric sclera) ผู้ป่วย มีรูปหน้าและการเจริญเติบโตปกติ ค่า Hb และ Hct ต่ำกว่าปกติเล็กน้อย ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่ต้อง รักษาโดยการรับเลือด แต่อาการซีดอาจเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดการติดเชื้อ อักเสบ หรือได้รับยาบางชนิด ที่กระตุ้นให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตก ซึ่งโรคฮีโมโกลบินเอชชนิดนี้เกิดจากปฏิสัมพันธ์ ระหว่างยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิด gene deletion โดยรูปแบบ ของยีนที่ทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอชที่พบบ่อยในประเทศไทยคือ SEA deletion/3.7-kb deletion ( $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$ ) ซึ่งพบได้ร้อยละ 51 ในภาคใต้ (Laosombat *et al.*, 2009) ร้อยละ 43.6 ใน ภาคกลาง (Fucharoen and Winichagoon, 2011) ร้อยละ 25 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Boonsa *et al.*, 2004) และร้อยละ 33.3 ในภาคเหนือ (Charoenkwan *et al.*, 2005) ของประเทศไทย

2) Non-deletional Hb H disease คือ โรคฮีโมโกลบินเอช ชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการขาด หายไปของยีน ผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิดนี้ มีอาการทางคลินิกที่รุนแรงกว่าผู้ป่วยโรค ฮีโมโกลบินเอชชนิดที่เกิดจากการขาดหายไปของยีน นั่นคือ ค่าฮีโมโกลบินและฮีมาโตคริตต่ำกว่า ผู้ป่วยมีโอกาสซีดหลังจากเป็นไข้ได้มากกว่า มีตับและม้ามโต ในบางรายอาจมีรูปหน้า ผิดปกติแบบธาลัสซีเมีย (thalassemia facies) พบภาวะดีซ่านและอาจพบนิ่วในถุงน้ำดีได้ โรค ฮีโมโกลบินเอชชนิดนี้เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ร่วมกับแอลฟาธาลัสซี เมีย 2 ชนิด non-deletion โดยรูปแบบของยีนที่ทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอชที่พบบ่อยใน ประเทศไทยคือ SEA deletion/CS ( $--^{SEA}/\alpha^{CS}$ ) ซึ่งพบได้ร้อยละ 37.4 ในภาคใต้ (Laosombat *et*

*al.*, 2009) ร้อยละ 51 ในภาคกลาง (Fuchareon and Winichagoon, 2011) ร้อยละ 67.3 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Boonsa *et al.*, 2004) และร้อยละ 53.9 ในภาคเหนือ (Charoenkwan *et al.*, 2005) ของประเทศไทย โดยความถี่เป็นร้อยละของผู้ป่วย รวมถึงอาการทางคลินิกและค่าทางโลหิตวิทยาได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 3 และตารางที่ 4

**ตารางที่ 3** ความถี่ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช แยกตามชนิด และการกระจายตามภูมิภาคของประเทศไทย (Boonsa *et al.*, 2004; Fuchareon and Winichagoon, 2011; Laosombat *et al.*, 2009 ;และ Charoenkwan *et al.*, 2005)

$\alpha$ -globin gene genotype	ความถี่เป็นร้อยละของผู้ป่วย			
	ภาคใต้	ภาคกลาง	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ภาคเหนือ
<b>Deletional Hb H disease</b>				
-- <sup>SEA</sup> / <sub>-</sub> $\alpha^{3.7}$	51.0	38.04	25.0	33.3
-- <sup>SEA</sup> / <sub>-</sub> $\alpha^{4.2}$	4.8	1.42	1.92	9.8
-- <sup>THAI</sup> / <sub>-</sub> $\alpha^{3.7}$	0.7	0.28	ND	ND
-- <sup>SEA</sup> / <sub>-</sub> $\alpha^{4.2}$ (Q-Thailand)	ND	0.28	ND	ND
<b>Non-deletional Hb H disease</b>				
-- <sup>SEA</sup> / <sub>CS</sub> $\alpha$	37.4	51.0	67.30	53.9
-- <sup>SEA</sup> / <sub>PS</sub> $\alpha$	2.7	6.48	5.76	2.9
-- <sup>THAI</sup> / <sub>CS</sub> $\alpha$	1.4	0.28	ND	ND
-- <sup>SEA</sup> / <sub>OS</sub> $\alpha$	1.4	0.56	ND	ND
-- <sup>SEA</sup> / <sub>Poly A</sub> $\alpha$	0.7	0.28	ND	ND
-- <sup>SEA</sup> / <sub>PNP</sub> $\alpha$	ND	0.84	ND	ND
-- <sup>SEA</sup> / <sub>int A-G</sub> $\alpha$	ND	0.28	ND	ND
-- <sup>SEA</sup> / <sub>unknown</sub> $\alpha$	ND	0.28	ND	ND

ND หมายถึง ไม่ได้มีการศึกษา (not detect)



ตารางที่ 4 อาการทางคลินิกที่พบในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช แยกตามชนิดของมิวเตชัน (Fuchareon and Winichagoon, 2011; และ Laosomatet *et al.*, 2009)

อาการทางคลินิก และค่าทางโลหิตวิทยา	Deletional Hb H disease	Non-deletional Hb H disease	Normal	
			Male	female
อายุที่ได้รับเลือดครั้งแรก (ปี)	11 ± 5.5	1.5 ± 2.1	-	-
อาการซีดหลังมีไข (%)	68.7	89.10	-	-
Hepatomegaly (%)	25.30	93.75	-	-
Splenomegaly (%)	16.9	90.62	-	-
Hb (g/dl)	9.16 ± 1.07	8.1 0 ± 1.18	13.00 - 18.00	12.00 - 16.00
Hct (%)	30.20 ± 3.70	29.50 ± 3.40	40 - 54	37 - 47
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	5.41 ± 0.58	4.20 ± 0.70	4.50 - 6.30	4.20 - 5.50
MCV (fL)	56.00 ± 6.10	71.0 ± 7.60	83 - 97	83 - 97
MCH (pg)	16.80 ± 1.43	19.00 ± 1.89	27 - 33	27 - 33
MCHC (g/dl)	30.10 ± 1.30	26.80 ± 1.50	31 - 35	31 - 35
Hb Bart's (%)	3.79 ± 1.22	7.64 ± 3.32	0	0
Hb A (%)	90.00 ± 4.1	84.60 ± 10.60	97.00 - 98.00	97.00 - 98.00
Hb A <sub>2</sub> (%)	1.56 ± 0.31	1.35 ± 0.96	2.50 - 3.50	2.50 - 3.50

### 1.2.5 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากชนิดของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรไทยมีความหลากหลาย จึงไม่มีการทดสอบใดการทดสอบหนึ่งทางห้องปฏิบัติการที่ให้การตรวจวินิจฉัยได้อย่างครอบคลุมความผิดปกติได้ทุกชนิด โดยทั่วไปการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติในหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรส มี 3 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 การตรวจคัดกรอง (screening test) เป็นการตรวจขั้นต้นแรก มีเป้าหมายหลักคือ การคัดเอาคนปกติออกไป เพื่อที่จะไม่ต้องตรวจเลือดต่อ คงเหลือแต่ผู้ที่น่าจะมีความผิดปกติของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ที่จะเข้าสู่กระบวนการตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป เพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย

ในประเทศไทย การตรวจคัดกรองที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข ประกอบด้วยการตรวจ one tube osmotic fragility

test (OF test) และการทดสอบฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรโดยการตกตะกอนด้วยสาร dichlorophenolindophenol (DCIP) หรือ มีการตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (red blood cell indices) ร่วมด้วย เช่น ปริมาตรเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (mean corpuscular volume, MCV) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (mean corpuscular hemoglobin, MCH) ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) และดูรูปร่างของเม็ดเลือดจากสเมียร์เลือด

ระดับที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด (hemoglobin typing) สามารถตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่ไม่ซับซ้อนได้เกือบทุกชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย ยกเว้นพาหะของแอลฟาธาลัสซีเมีย โดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติสำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ในผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอชจะตรวจพบ Hb H จากการทำ Hb typing

ระดับที่ 3 การตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ (DNA analysis) ใช้ในกรณีที่ผลการตรวจ Hb typing ในระดับที่ 2 ไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ชัดเจน หรือ กรณีต้องการทราบชนิดของมิวเตชันของธาลัสซีเมีย เพื่อการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

การตรวจความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของแอลฟาธาลัสซีเมีย โดยทั่วไปแล้วจะใช้วิธี PCR ควบคู่ไปกับเทคนิคทางอณูวิทยาอื่นๆ เพื่อให้ได้ผลที่มีความเที่ยงตรง แม่นยำมากขึ้น ซึ่งแต่ละเทคนิคมีความเหมาะสมกับการตรวจชนิดมิวเตชัน และมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน การที่ห้องปฏิบัติการจะเลือกใช้วิธีใด ขึ้นอยู่กับความเชี่ยวชาญทางด้านเทคนิค และชนิดมิวเตชันของธาลัสซีเมียที่พบได้บ่อยในบริเวณนั้นๆ ซึ่งเทคนิคที่ใช้ได้สรุปในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เทคนิคทางอณูวิทยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ DNA สำหรับโรคธาลัสซีเมีย

ชนิดของความผิดปกติ/วิธีทางอณูวิทยาที่ใช้ตรวจ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
<p><b>Gene deletion</b></p> <p>- <i>Multiplex PCR</i></p>	<p>- สามารถตรวจความผิดปกติได้หลายความผิดปกติ ในการทำปฏิกิริยาเพียง 1 ครั้ง</p>	<p>- ประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนต่ำ เนื่องจากมีการแข่งขันในการใช้ dNTPs , MgCl<sub>2</sub> และ reagents อื่นๆ ในการทำปฏิกิริยา PCR</p>	<p>Nopparatana, <i>et al.</i>, 1998</p>
<p>- <i>Real-time Gap-PCR with SYBR Green</i></p>	<p>- สามารถอ่านผลได้ทันที เป็นการประหยัดเวลาที่ใช้วิเคราะห์ มีความไวและความจำเพาะสูง อีกทั้งมีความปลอดภัยจากสารอันตราย เนื่องจากไม่ต้องใช้ ethidium bromide</p>	<p>- เครื่องมือและ probe ต่างๆ ที่ใช้ มีราคาแพง</p>	<p>Liu <i>et al.</i>, 2000</p>
<p>- <i>array CGH</i></p>	<p>- เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถให้ผลการตรวจที่แม่นยำ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติได้หลายชนิดในคราวเดียวกัน เนื่องจากสามารถบรรจุ probe ได้มากถึง 72,000 probe ต่อ 1 สไลด์</p>	<p>- เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง การแปลผลต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญ</p>	<p>Pornprasert <i>et al.</i>, 2008</p>

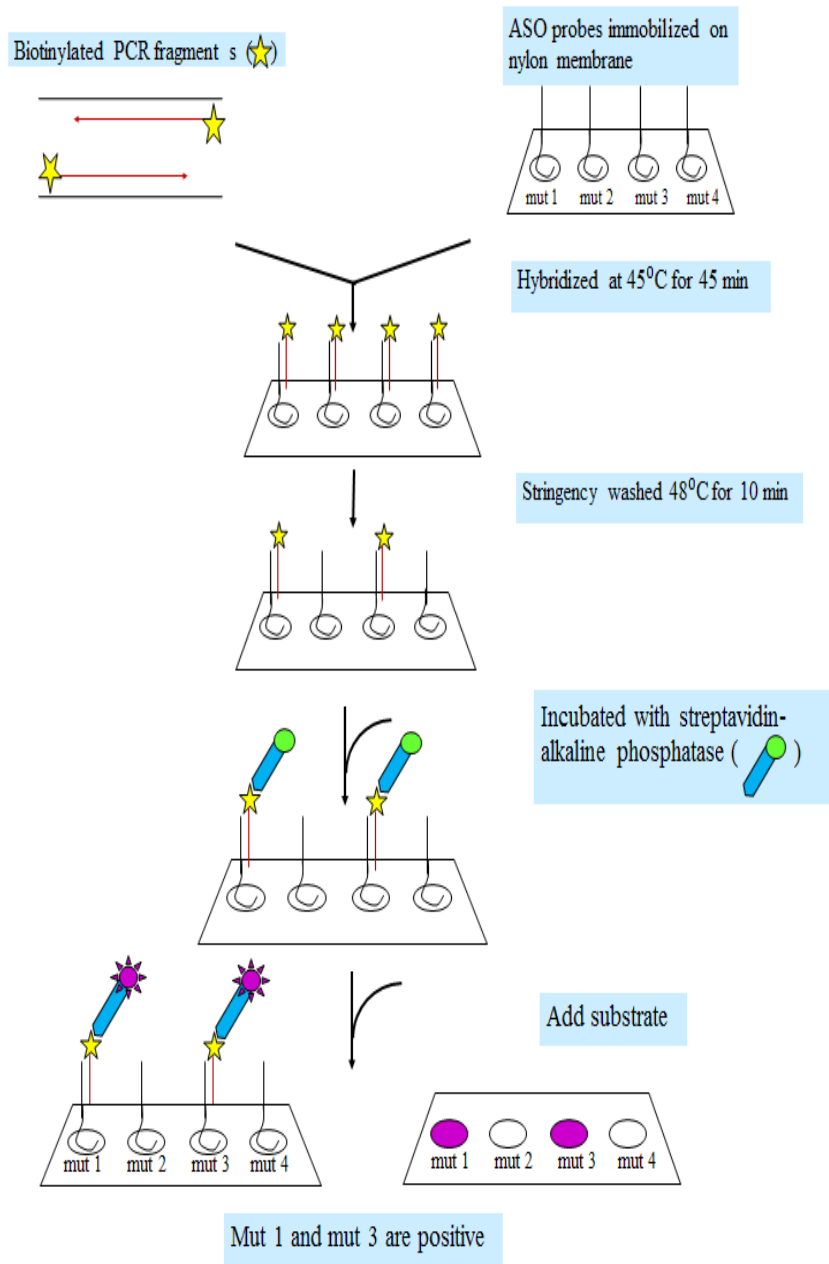
ตารางที่ 5 (ต่อ)

ชนิดของความผิดปกติ/วิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ตรวจ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
<p><b>Gene deletion</b></p> <p>- <i>colorimetric nanogold</i></p> <p>- <i>nanoplex microsatellite markers</i></p>	<p>- สามารถตรวจยีนแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด -SEA, <math>-\alpha^{3.7}</math> และ <math>-\alpha^{4.2}</math> ได้</p> <p>- สามารถแยกได้ว่าผู้ป่วยมียีนที่เป็นรูปแบบ homozygous หรือ heterozygous ได้</p> <p>- สามารถตรวจหาความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบินได้อย่างครอบคลุมเนื่องจากใช้ microsatellite marker ที่ครอบคลุมยีนกลุ่มแอลฟาโกลบินขนาด 1 เมกะเบส ทำให้ไม่ต้องมีการปรับแต่ง marker สำหรับการตรวจวัดมิวเตชันแต่ละชนิด</p>	<p>- มีความยุ่งยากในขั้นตอนการเตรียมอนุภาคทอง</p> <p>- ในบางกรณีอาจต้องใช้อุปกรณ์วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm เพื่อการวินิจฉัยว่าเป็น heterozygous stage หรือไม่</p> <p>- เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง</p> <p>- การแปลผลต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญ</p>	<p>Chomean <i>et al.</i>, 2013</p> <p>Chen <i>et al.</i>, 2015</p>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ชนิดของความผิดปกติ/วิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ตรวจ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
<b>Point mutation</b> - <i>reverse dot blot hybridization</i>	- สามารถตรวจวิเคราะห์การเกิดมิวเตชันได้ครั้งละหลายชนิด โดยอาศัย allele-specific oligonucleotide probe ที่สามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอที่ผิดปกติ หรือ ปกติได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ	- ไม่สามารถตรวจได้ครอบคลุมทุกชนิด เนื่องจากมีมิวเตชันหลายชนิดที่พบได้ไม่บ่อย และยังมีมิวเตชันที่ไม่ทราบชนิดอื่นๆ อีก	Lin <i>et al.</i> , 2012
- <i>amplification refractory mutation system (ARMS)</i>	- มีความจำเพาะและสามารถตรวจวัดผลได้อย่างรวดเร็ว	- ต้องย้อมเจลด้วยสาร ethidium bromide ซึ่งเป็นสารอันตราย	Wee <i>et al.</i> , 2009

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เลือกวิธี reverse dot blot hybridization มาพัฒนาเพื่อตรวจวิเคราะห์มิวเตชันของโรคฮีโมโกลบินเอช ซึ่งเทคนิค reverse dot blot hybridization (RDB) เป็นเทคนิคที่ใช้หาชนิดของมิวเตชันได้หลายชนิดในคราวเดียวกัน โดยมีหลักการคือ สร้าง allele-specific oligonucleotide probes (ASO probes) ที่จำเพาะกับมิวเตชันแต่ละชนิด ซึ่งโพรบแต่ละชนิดจะมีการติดปลาย 5' ด้วยหมู่อะมิโน ( $\text{NH}_2$ ) นำโพรบมาตรึงลงบนแผ่นเมมเบรนที่มีประจุลบ แล้วนำ PCR product ของผู้ป่วยที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) มาทำปฏิกิริยาเข้าคู่ (hybridization) กับ ASO probe หลังจากนั้นอ่านผลโดยดูจากสีของปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์ ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว สามารถทราบชนิดของมิวเตชันของธาลัสซีเมียหลายชนิด และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนราคาแพง ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา RDB สรุปได้ดังไดอะแกรมรูปที่ 5



รูปที่ 5 ไคอะแกรมสรุปการทำปฏิกิริยา reverse dot blot hybridization

### 1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. ประยุกต์ใช้เทคนิค reverse dot blot hybridization ในการตรวจหาชนิดของมิวเตชันในผู้ป่วยแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอช
2. ระบุชนิดของมิวเตชันบนยีนแอลฟาโกลบินในผู้ป่วยแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอช
3. คำนวณความถี่อัลลีลของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียจากผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

## บทที่ 2

### วิธีการวิจัย

#### 2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

##### 2.1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

#### ตารางที่ 6 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต (ประเทศที่ผลิต)
Absolute ethanol	Mallinckrodt (Canada)
Agarose gel	Gibthai (USA)
5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate-4-toludine salt (BCIP)	Boehringer - Mannheim (Germany)
Bromophenol blue	Merck (Germany)
Deoxyribonucleotide Triphosphate (dNTPs)	Invitrogen (California)
Disodium-ethylenediamine tetra-acetate dehydrate (EDTA)	Merck (Germany)
Ethidium Bromide (EtBr)	Sigma (USA)
1-Ethyl-3-(3-dimethylainopropyl)carbodiimide HLC (EDC)	Sigma (USA)
Mineral oil	Sigma (USA)
Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)	Boehringer - Mannheim (Germany)
Sodium acetate	Merck (Germany)
Sodium carbonate	Merck (Germany)
Sodium chloride	Merck (Germany)
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Sigma (USA)
Sodium hydrogen carbonate	Merck(Germany)
Sodium hydroxide	Merck (Germany)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Trisma base)	Merck (Germany)



### 2.1.2 เอนไซม์

ตารางที่ 7 เอนไซม์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

เอนไซม์	บริษัทที่ผลิต (ประเทศที่ผลิต)
Proteinase K	Invitrogen (California)
Streptavidin-alkaline phosphatase	Boehringer - Mannheim (Germany)
Taq DNA polymerase and reaction buffer	Invitrogen (California)

### 2.1.3 อุปกรณ์

ตารางที่ 8 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์	Model	บริษัทที่ผลิต (ประเทศที่ผลิต)
Autoclave	HA-24	Hirayama (Japan)
Alpha imager system	92-14023-00	Alpha Innotech (Taiwan)
Autopipett ขนาด p2, p20, p200, p1,000	Discovery	Eppendorf (Germany)
Centrifuge	2-6E	Saratorious (Germany)
Electrophoresis Gel Sstem		Mupid-2 (Japan)
Electrophoresis Power supply	KD-600	Toyozumi Dengenkiki (Japan)
Micro high speed Centrifuge	MC-150	Tomy Seiko (Japan)
Microwave	-	National
Refrigerator	-	Sharp
Shaking Water bath	ZHWY-11X30	Zhieng (China)
Thermal Cycler หรือ Gene cycler	MJ-mini	Bio-Rad (California)
Vortex	G-560E	Scientific industry (USA)
เครื่องเขย่า	CRCO	FINEPCR (Korea)

## 2.1.4 วัสดุ

## ตารางที่ 9 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุ	บริษัทที่ผลิต (ประเทศที่ผลิต)
Biodyne C nylon membrane	Life Science (Mexico)
Pipett tip ขนาด 2 µl, 200 µl, และ 1,000 µl	Gibthai (USA)
Plastic microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml, 0.5 ml, 1.0 ml, และ 2.0 ml	Gibthai (USA)
Plastic sealer	(Thailand)
Plastic tray	Genelab Diagnostic (California)

## 2.1.5 Oligonucleotide primers and probes

การออกแบบ oligonucleotide primers และ probe ที่ใช้ในการทดลองอ้างอิงจากลำดับเบสของ *Homo sapiens* alpha globin region (HBA@); and hemoglobin, alpha 1 (HBA1); and hemoglobin, alpha 2 (HBA2); and hemoglobin, mu (HBM); and hemoglobin, theta 1 (HBQ1); and hemoglobin, zeta (HBZ), RefSeqGene on chromosome 16 จากฐานข้อมูล NCBI เลขที่อ้างอิง (NCBI Reference Sequence) NG\_000006.1 โดยการออกแบบด้วยโปรแกรม OLIGO Primer Analysis Software Version 7 (OLIGO7) ซึ่งผลิตโดย Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, USA (<http://www.oligo.net/>) โดยหลักการในการออกแบบและเลือก oligonucleotide primers และ probe โดยมีคุณสมบัติดังนี้

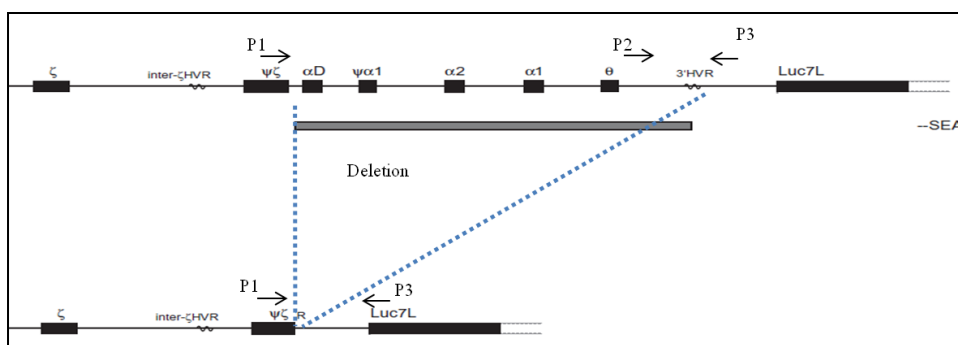
- 1) มีขนาด 15-24 nucleotides
- 2) มีค่า Tm อยู่ในช่วง 55-65 °C
- 3) ปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 40-60%

4) หลีกเลียงโครงสร้างทุติยภูมิ ( $2^{\text{nd}}$  structure) ของ oligonucleotide primers และ probe จากการมีลำดับเบสในสายที่เป็นคู่สมกัน

#### 2.1.5.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา multiplex gap-PCR

Multiplex gap-PCR เป็นวิธีที่ใช้หาความผิดปกติของ DNA ชนิดการขาดหายไปขนาดหลายกิโลเบส โดยใช้ไพรเมอร์ 3 เส้น ต่อมิวเตชัน 1 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 6 โดยออกแบบให้ใช้ไพรเมอร์ 1 เส้นร่วมกัน (common primer) คือไพรเมอร์ P3 และมีไพรเมอร์ที่ทำปฏิกิริยาคร่อมบริเวณรอยต่อของ DNA ที่เกิดจากการขาดหายไป (break point junction) คือไพรเมอร์ P1 ซึ่งไพรเมอร์ P1 และ P3 จะเพิ่มจำนวน DNA เฉพาะที่เกิดการขาดหายไปเท่านั้น เนื่องจากระยะห่างของไพรเมอร์ทั้งสองที่จับกับอัลลีลปกติมีมากกว่าความสามารถของปฏิกิริยา PCR ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ส่วนไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนอัลลีลปกติจะออกแบบให้อยู่ในบริเวณที่ DNA ขาดหายไปคือไพรเมอร์ P2 กับ P3

ตำแหน่งของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการทดลองสำหรับตรวจหามิวเตชันแต่ละชนิด แสดงไว้ในรูปที่ 7 โดยไพรเมอร์แต่ละเส้นจะติดฉลากที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ด้วยไบโอติน (biotin) เพื่อใช้สำหรับการตรวจวัดผลในขั้นตอน reverse dot blot hybridization ต่อไป

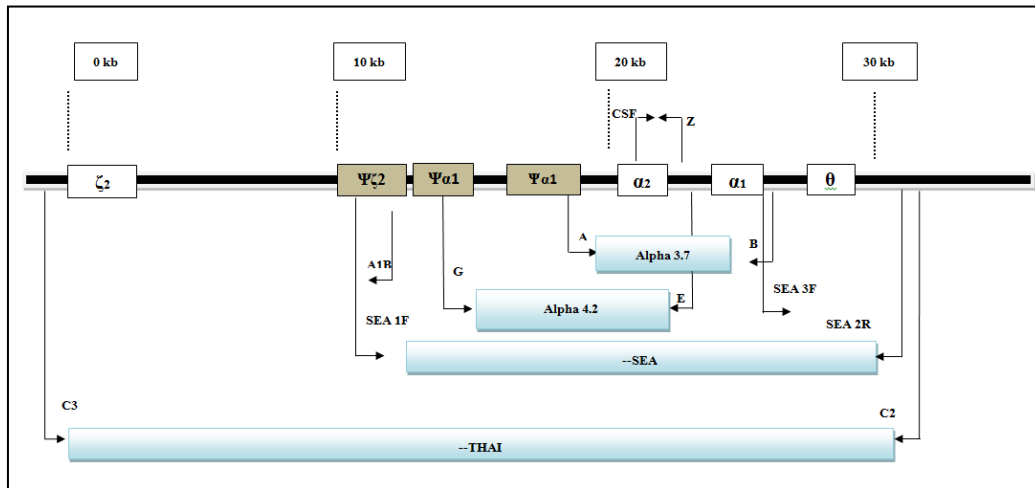


รูปที่ 6 ตำแหน่งไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา multiplex gap-PCR

ไพรเมอร์ P3 เป็นไพรเมอร์ร่วม (common primer)

ไพรเมอร์ P1 และ P3 ใช้สำหรับตรวจการขาดหายไปของยีน

ไพรเมอร์ P2 และ P3 ใช้สำหรับตรวจอัลลีลปกติ



รูปที่ 7 ตำแหน่งของไพรเมอร์แต่ละชุดบน  $\alpha$ -globin gene cluster ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

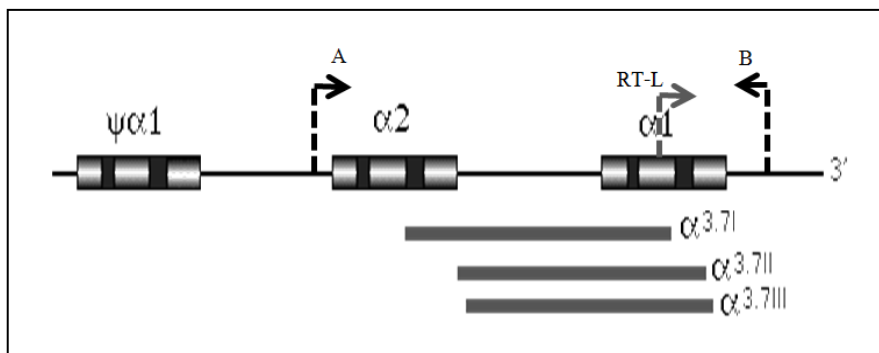
- 1) ไพรเมอร์ A และ B สำหรับการตรวจมิวเตชัน  $-\alpha^{3.7}$
- 2) ไพรเมอร์ G และ E สำหรับการตรวจมิวเตชัน  $-\alpha^{4.2}$
- 3) ไพรเมอร์ SEA1F และ SEA2R สำหรับการตรวจมิวเตชันชนิด SEA
- 4) ไพรเมอร์ C2 และ C3 สำหรับการตรวจมิวเตชันชนิด THAI
- 5) ไพรเมอร์ SEA1F และ A1B สำหรับการตรวจอัลลีลปกติของมิวเตชันชนิด THAI
- 6) ไพรเมอร์ SEA3F และ SEA2R สำหรับการตรวจอัลลีลปกติของมิวเตชันชนิด SEA
- 7) ไพรเมอร์ CSF และ Z สำหรับการตรวจมิวเตชันภายใน exon3 ของยีน  $\alpha_2$

#### 2.1.5.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา nested-PCR

การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี nested-PCR เป็นการทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 2 ครั้ง โดยในครั้งแรกจะเพิ่มจำนวนยีนที่ครอบคลุมตำแหน่งมิวเตชันที่ต้องการตรวจ และในครั้งที่ 2 เป็นการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ PCR product จากครั้งแรกเป็น template แทน genomic DNA ซึ่งจะ ได้ชิ้น PCR product ที่มีขนาดเล็กกว่าและจำเพาะต่อมิวเตชันแต่ละชนิด

วิธี nested-PCR เป็นการเพิ่มจำนวน DNA เพื่อแยกชนิดย่อยของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิดขนาดหายไป 3.7 กิโลเบส ( $-\alpha^{3.7}$ ) มี 3 ชนิดย่อย คือ  $-\alpha^{3.7I}$ ,  $-\alpha^{3.7II}$  และ  $-\alpha^{3.7III}$  ซึ่งมีตำแหน่งของ breakpoint junction แตกต่างกัน (Dode *et al.*, 1992) การศึกษาในครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ A และ B สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน  $-\alpha^{3.7}$  ในปฏิกิริยา

ครั้งแรก และออกแบบไพรเมอร์ RT-L เพื่อเพิ่มจำนวนบริเวณ intron 2 และ exon 3 ของยีนร่วมกับไพรเมอร์ B โดยใช้ PCR product จากไพรเมอร์ A และ B เป็นแม่พิมพ์ เพื่อจำแนกชนิดย่อยดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ตำแหน่งไพรเมอร์ A และ B ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีน  $-\alpha^{3.7}$  สำหรับปฏิกิริยา PCR ครั้งแรก และไพรเมอร์ RT-L กับไพรเมอร์ B สำหรับปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 เพื่อใช้แยกชนิดย่อยของมิวเตชันของ  $-\alpha^{3.7}$  ทั้ง 3 ชนิด

#### 2.1.5.3 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ (Oligonucleotide probes)

การทดลอง reverse dot blot hybridization มีการออกแบบโพรบจำนวน 2 ชุด คือชุดโพรบสำหรับอัลลีลปกติ (normal probes, N) ซึ่งออกแบบให้สามารถเข้าคู่กันได้ (hybridization) กับ PCR product ที่ได้จากอัลลีลปกติ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูล NCBI ของโครโมโซม 16p13.3  $\alpha$ -globin gene (NG\_000006.1) และชุดโพรบสำหรับอัลลีลที่ผิดปกติ (mutant probes, M) ซึ่งออกแบบให้สามารถเข้าคู่กับอัลลีลที่มีมิวเตชัน โดยใช้ฐานข้อมูล [http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query\\_vars3](http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3) สำหรับมิวเตชันทั้งแบบการขาดหายไปของยีนขนาดใหญ่ และมิวเตชันเฉพาะจุดบนยีนแอลฟาโกลบิน

## 2.1.6 การเตรียมสารเคมีและน้ำยา (Reagents)

### 2.1.6.1 สารเคมีและน้ำยาสำหรับการสกัด DNA จากเลือด

สกัด DNA จากเลือดของผู้ป่วยโดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Blood/cultured Cell) จากบริษัท Geneaid ประเทศไต้หวัน ประกอบด้วยสารเคมีและน้ำยา ดังนี้

- Absolute alcohol
- Elution Buffer
- GB Buffer
- Proteinase K 10 mg/ml
- TE Buffer
- Wash Buffer
- W1 Buffer

### 2.1.6.2 สารเคมีและน้ำยาสำหรับการเตรียม agarose gel electrophoresis

- 2% agarose gel
- 50x agarose gel buffer (50x TAE)
- Electrophoresis running buffer (0.5x TAE)
- Ethidium bromide ความเข้มข้น 1 mg/L
- Gel loading buffer

### 2.1.6.3 สารเคมีและน้ำยาสำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Deoxynucleotide triphosphate mixture (dNTPs mixture) ประกอบด้วย dATP, dGTP, dTTP, dCTP ความเข้มข้น 2mM
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide)
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- Mineral oil
- 10X PCR buffer
- PCR primers ความเข้มข้น 30 pmol/μl ประกอบด้วยไพรเมอร์ SEA 1F, SEA 2R, SEA 3F, A1B, C2, C3, CSF, Z, A, B, RT-L, G-Bi, E, และ F
- *Taq* DNA polymerase

#### 2.1.6.4 สารเคมีและน้ำยาสำหรับการตรึง ASO – probes บนแผ่น nylon membrane

- Amino-modified ASO probes
- 0.5 M sodium bicarbonate buffer
- 16 % EDC [1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl]
- 0.1 N NaOH

#### 2.1.6.5 สารเคมีและน้ำยาสำหรับ hybridization และ detection

- 10 % SDS
- 20x SSPE: 3.6 M NaCl/ 0.2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O / 20 mM
- 1 M Tris pH 9.5
- Hybridization buffer: 3x SSPE/ 0.5 % SDS
- Washing buffer: 2x SSPE/ 0.1 % SDS
- Detection buffer: 0.1 M Tris/ 0.1 M NaCl / 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- streptavidin-AP (Boehringer - Mannheim)
- liquid NBT / BCIP (Boehringer - Mannheim)

#### 2.1.7 ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มารับการรักษาและตรวจคัดกรองที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่ปี 2535-2558

## 2.2 วิธีดำเนินการ

### 2.2.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่างปี พ.ศ. 2535-2558 (1992-2015) โดยเลือดจะถูกเก็บมาจากหลอดเลือดดำของผู้ป่วย ใสในหลอดปลอดเชื้อที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA ที่ส่งตรวจห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยาของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ เพื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน ด้วยเครื่อง automated Hb-HPLC analyzer (Variant™; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

#### 2.2.1.1 การคำนวณกลุ่มตัวอย่างในการทดลอง

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$\begin{aligned}
 n &= (Z_{\alpha/2})^2 \times P \times (1-P) / d^2 \\
 Z_{\alpha/2} &= 1.96 \text{ (จากค่า } p\text{-value} = 0.05) \\
 P &= 0.90 \text{ (ความแม่นยำจากการตรวจสอบด้วยวิธี RDB เท่ากับ 90\%)} \\
 d &= 0.05 \text{ (ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้} = 5 \%) \\
 n &= 1.96^2 \times 0.90 \times (1 - 0.90) / (0.05)^2 \\
 &= 138.29
 \end{aligned}$$

ต้องใช้กลุ่มตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 139 ตัวอย่าง

### 2.2.1.2 การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

เกณฑ์การเลือกกลุ่มตัวอย่าง คัดเลือกจากผู้ที่มาใช้บริการที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ไม่จำกัดเพศ ไม่จำกัดอายุ มีผลการตรวจ Hb typing เป็น A<sub>2</sub>A H, A<sub>2</sub>A Bart's H, CS A<sub>2</sub>A, CS A<sub>2</sub>A Bart's, CS A<sub>2</sub>A Bart's H ส่วนกลุ่มควบคุม ใช้เลือดจากผู้ที่มีผลการตรวจ Hb typing เป็น A<sub>2</sub>A หรือ Normal

### 2.2.1.3 การเตรียม DNA

การเตรียม DNA ทำได้โดยการสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ใช้ชุดสกัดจากบริษัท Geneaid ชุด Genomic DNA minikit (blood/cultured cell) มีขั้นตอนการสกัดดังนี้

- 1) ใช้เลือดจากตัวอย่าง 0.1 ml ผสมกับสารละลาย TE ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน และปั่น ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีเมื่อครบเวลา เทสารละลายส่วนใสออก และทำซ้ำจนสารละลายใส
- 2) นำตะกอนที่ได้มาทำให้ตะกอนแตก แล้วเติม GB buffer 200  $\mu$ l เติม 10 mg/ml protinase K ปริมาตร 10  $\mu$ l
- 3) ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เปิดเครื่อง water bath ตั้งอุณหภูมิที่ 58°C พร้อมทั้งอุ่น EB buffer ที่ 58°C
- 4) เมื่อครบเวลา เติม absolute ethanol 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วเทสารละลายลงใน GD column
- 5) นำ GD column ไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที



- 6) เทสารละลายได้คอลลัมน์ทิ้ง เติม wash buffer ที่ผสม ethanol ปริมาตร 600  $\mu$ l นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลา เทสารละลายได้คอลลัมน์ทิ้ง
- 7) ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- 8) นำ GD column ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่
- 9) เติม EB buffer ที่อุ่นแล้ว ปริมาตร 200  $\mu$ l วางทิ้งไว้ 3 นาที
- 10) ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที สารละลาย DNA จะถูกปั่นตกลงมาในหลอดทดลอง
- 11) นำ DNA ที่เตรียมได้ไปตรวจวัดความเข้มข้นและตรวจสอบคุณภาพ

## 2.2.2 การเพิ่มปริมาณ DNA

2.2.2.1 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี multiplex gap-PCR บริเวณยีนแอลฟาโกลบิน สำหรับการตรวจความผิดปกติของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด SEA และ THAI และมิวเตชันเฉพาะจุดชนิด Hb Constant Spring, Hb Paksé, Hb Suan Dok, และ Hb Quong Sze

เมื่อได้ตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจหาชนิดมิวเตชันแล้ว นำตัวอย่าง DNA มาเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีนแอลฟาโกลบิน โดยใช้ส่วนประกอบดังตารางที่ 10 และขั้นตอนการทำ PCR ใช้โปรแกรมชื่อ RDB ประกอบด้วยขั้นตอนในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Bio-Rad ดังนี้

Denaturation	95 °C	7	นาที	} 30 รอบ
Denaturation	94 °C	1.15	นาที	
Annealing	56 °C	1.15	นาที	
Extension	72 °C	1.15	นาที	
Extension	72 °C	15	นาที	
Cool down	4 °C	5	นาที	

ตารางที่ 10 ส่วนประกอบของ PCR mixture ในหลอดทดลองสำหรับเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีน แอลฟาโกลบินสำหรับการตรวจความผิดปกติของแอลฟาธาลัสซีเมีย1 และมิวเตชันเฉพาะจุด

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (μl)
สารละลาย DNA (100-200 ng/μl)	5.0
5x-Q solution (betaine)	10.0
2mM dNTPs	5.0
10x PCR reaction buffer	3.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
30 μM SEA 1F	1.0
30 μM SEA 2R	1.0
30 μM SEA 3R	1.0
30 μM A1B	1.0
30 μM C2	1.0
30 μM C3	1.0
30 μM CSF	1.0
30 μM Z	1.0
5 units of BIOTAQ™ DNA Polymerase	0.2
Distilled Water	17.0
Total volume	50.0

- หมายเหตุ
- 1) ไพรมเมอร์ชุด SEA1F, SEA2R, SEA3F, และ A1B ใช้สำหรับการตรวจมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมีย1 ชนิด SEA
  - 2) ไพรมเมอร์ชุด C2 และ C3 ใช้สำหรับการตรวจมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมีย1 ชนิด THAI
  - 3) ไพรมเมอร์ชุด CSF และ Z ใช้สำหรับการตรวจมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมีย2 ซึ่งเป็นมิวเตชันเฉพาะจุด ประกอบด้วยชนิด Hb Constant Spring, Hb Paksé, Hb Suan Dok, และ Hb Quong Sze

### 2.2.2.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี Nested-PCR สำหรับตรวจความผิดปกติของ แอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 3.7-kb deletion

เมื่อได้ตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจหาชนิดของมิวเตชันแล้ว นำตัวอย่าง DNA มาเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีนแอลฟา โกลบิน โดยใช้ส่วนประกอบดังตารางที่ 11 ซึ่งขั้นตอนการทำ 1<sup>st</sup> PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้โปรแกรม Ja ประกอบด้วยขั้นตอนในเครื่อง Bio-Rad ดังนี้

Denaturation	95 °C	10	นาที	} 35 รอบ
Denaturation	94 °C	45	วินาที	
Annealing	60 °C	45	วินาที	
Extension	72 °C	1	นาที	
Extension	72 °C	20	นาที	
Cool down	8 °C	5	นาที	

สำหรับขั้นตอนการทำ 2<sup>nd</sup> PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้โปรแกรม RDB ในเครื่อง Bio-Rad มีดังนี้

Denaturation	95 °C	7	นาที	} 30 รอบ
Denaturation	94 °C	1.15	นาที	
Annealing	56 °C	1.15	นาที	
Extension	72 °C	1.15	นาที	
Extension	72 °C	15	นาที	
Cool down	4 °C	5	นาที	

ตารางที่ 11 ส่วนประกอบของ PCR mixture ในหลอดทดลองสำหรับเพิ่มจำนวน DNA สำหรับตรวจความผิดปกติของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 3.7-kb deletion

ส่วนประกอบ	1 <sup>st</sup> PCR ปริมาตร (μl)	2 <sup>nd</sup> PCR* ปริมาตร (μl)
สารละลาย DNA (100-200 ng/μl)	5.0	5.0
5x-Q solution (betaine)	10.0	10.0
10x PCR reaction buffer	5.0	5.0
2mM dNTPs	2.5	2.5
DMSO	2.5	2.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2.0	2.0
30 μM A	1.0	-
30 μM B	1.0	-
30 μM Z	1.0	-
30 μM RT-L	-	1.0
5 units of BIOTAQ™ DNA polymerase	0.1	0.1
Distilled Water	19.9	21.9
Total volume	50.0	50.0

\*เปลี่ยนสารละลาย DNA เป็น PCR product จาก 1<sup>st</sup> PCR

### 2.2.2.3 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี multiplex gap-PCR สำหรับการตรวจความ

ผิดปกติของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 4.2-kb deletion

เมื่อได้ตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจหาชนิดมิวเตชันแล้ว นำตัวอย่าง DNA มาเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีนแอลฟาโกลบิน โดยใช้ส่วนประกอบดังตารางที่ 12 ซึ่งขั้นตอนการทำ PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้โปรแกรม ALPHA ประกอบด้วยขั้นตอนในเครื่อง Bio-Rad ดังนี้

Denaturation	95 °C	7	นาที	} 35 รอบ
Denaturation	94 °C	1.15	นาที	
Annealing	66 °C	1.15	นาที	
Extension	72 °C	1.15	นาที	
Extension	72 °C	15	นาที	

Cool down 4 ° C 5 นาที

ตารางที่ 12 ส่วนประกอบของ PCR mixture ในหลอดทดลองสำหรับเพิ่มจำนวน DNA สำหรับการตรวจความผิดปกติของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 4.2-kb deletion

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
สารละลาย DNA (100-200 ng/μl)	5.0
5x-Q solution (betaine)	8.0
2mM dNTPs	3.0
10x PCR reaction buffer	3.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
DMSO	1.25
20 μM G-Bi	1.0
20 μM E	1.0
20 μM F	1.0
5 units of BIOTAQ™ DNA Polymerase	0.1
Distilled Water	20.8
Total volume	50.0

### 2.2.3 การทำ Reverse dot blot hybridization

#### 2.2.3.1 การเตรียมเมมเบรน

กระตุ้นให้เมมเบรนมีประจุลบ

- 1) แช่เมมเบรนใน 16% EDC นาน 15 นาที
- 2) ล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น และซับเมมเบรนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง

การยัด ASO-probes บนเมมเบรนที่ถูกกระตุ้นแล้ว

- 1) คำนวณความเข้มข้นของ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ โพรบ จากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

- 2) เจือจางโพรบให้มีความเข้มข้นตามต้องการ ด้วย 0.5 M sodium bicarbonate buffer
- 3) ใช้ automatic pipet คูดสารละลายโพรบ 1.5  $\mu$ l ซึ่งมีปริมาณนิวคลีโอไทด์ 2.5-5.0 pmole หยดลงบนแผ่นเมมเบรน ให้มีระยะห่างกันหยดละ 0.5 cm โดยหยดโพรบที่ใช้ตรวจสอบ “normal” (แถวบน) และ “mutant” (แถวล่าง) ให้อยู่คู่กัน ดังไดอะแกรมที่ 1

Normal	SEA1	SEA2	CSN	CSN	SDN	QSN	CSN	JN 1	JN 3	JN 5	No.
	THAI	SEA	CSM	PSM	SDM	QSM	4.2M	JN 2	JN 4	JN 6	
Mutant											

#### ไดอะแกรมที่ 1 แสดงตำแหน่งของโพรบที่ตรึงลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน

- 4) ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลามากกว่า 4 ชั่วโมง
- 5) นำแผ่นเมมเบรนที่มีโพรบอยู่ แช่ใน 0.1 M NaOH นาน 10 นาทีเพื่อทำให้เมมเบรนมีประจุเป็นกลาง (neutralization)
- 6) ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้ววางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 2.2.3.2 การทำไฮบริดเซชันและการตรวจวัดผล

##### Hybridization

- 1) คลายเกลียวของ biotiny PCR product ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยการต้มนาน 5 นาที
- 2) คูดสารละลาย Pre-hybridization buffer ใส่ถาดพลาสติกที่มีแผ่นไนลอนเมมเบรนซึ่งมีโพรบติดอยู่
- 3) นำ PCR product ที่ต้มไว้ ใส่ในถาดพลาสติก และปิดด้วย plastic sealer
- 4) เปลี่ยนน้ำยาและดีเอ็นเอให้ผสมทั่วกัน แช่ถาดในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 45°C ให้เกิดปฏิกิริยา hybridization นาน 45 นาที

- 5) เมื่อครบเวลา นำเมมเบรนที่ผ่านการ hybridization แล้ว ออกมาล้างใน ภาชนะที่ใส่น้ำยา washing buffer 1 ครั้ง และล้างด้วยน้ำยา washing buffer ที่อุณหภูมิ 49°C นาน 15 นาที

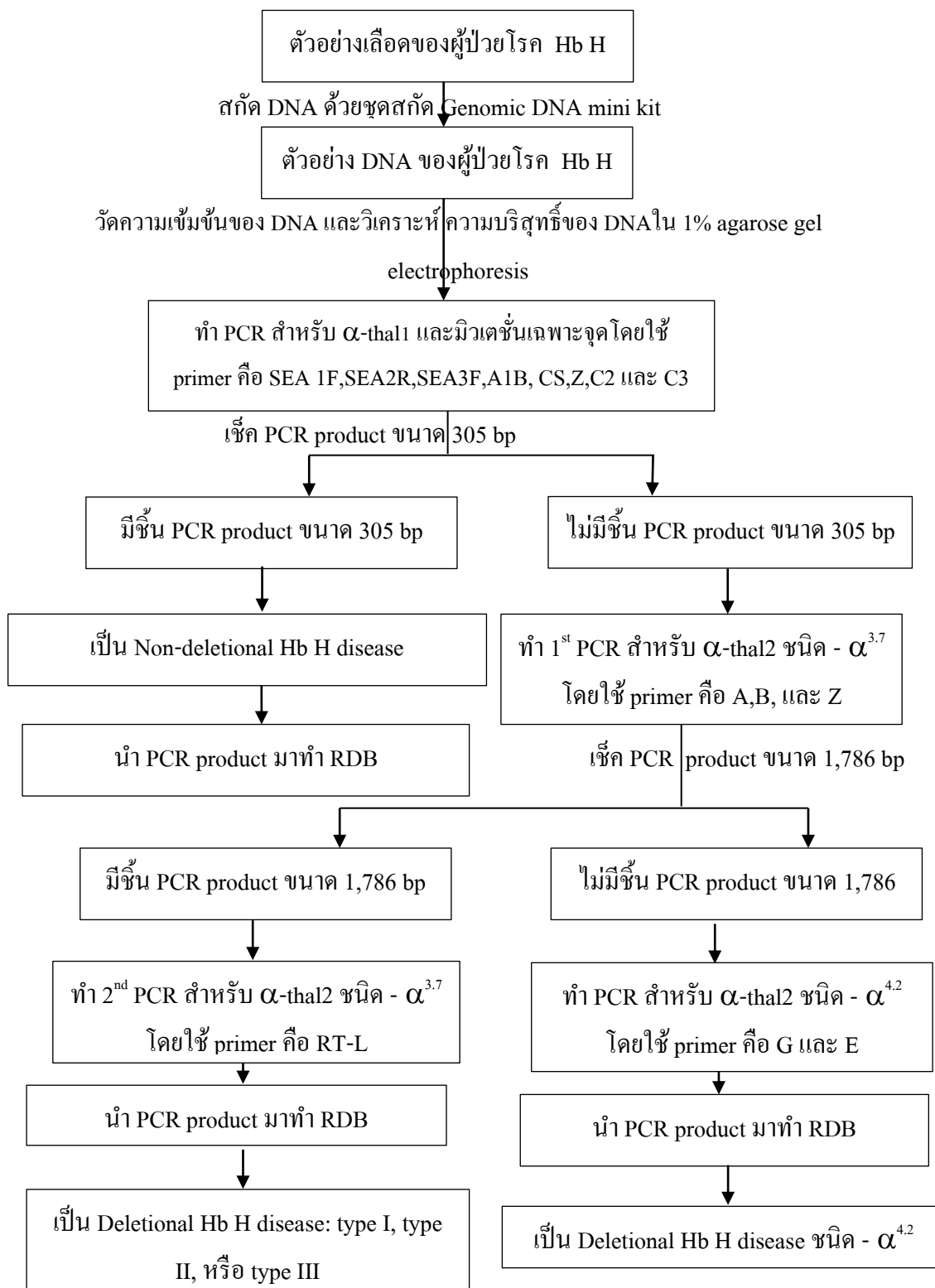
#### Conjugation

- 1) เชื่อม streptavidin กับ biotin ที่ติดฉลากอยู่บนสาย DNA ของ PCR product โดยผสม streptavidin-AP ปริมาตร 1  $\mu$ L กับ blocking solution ปริมาตร 1 mL (เจือจาง 1: 1,000)
- 2) บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
- 3) ล้างเมมเบรนด้วย 0.3% tween นาน 10 นาที โดยการวางบนเครื่องเขย่า

#### Detection

- 1) เตรียมสารในถาดพลาสติกหลุมใหม่
- 2) ผสมสารตั้งต้น NBT ปริมาตร 10  $\mu$ l และ BCIP ปริมาตร 7  $\mu$ l ใส่นิ detection buffer 2 ml ซึ่งมีเมมเบรนแช่อยู่ในถาดพลาสติก
- 3) บ่มบนเครื่องเขย่า โดยไม่ให้โดนแสง ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จะปรากฏสีม่วงเข้มขึ้นตรงตำแหน่งของ oligonucleotide probe ที่ hybridization กับ biotinylate DNA

ไดอะแกรมที่ 2 แผนภูมิสรุปขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์มีเวตซ์แอลฟาธาลัสซีเมีย1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย2 จากตัวอย่างผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช





## 2.2.3.3 การอ่านผลและแปลผล

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	No.
Mutant											

**ไดอะแกรมที่ 3** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลลบกับการตรวจ  $\alpha$ -thal จะพบจุดสีม่วงเฉพาะบริเวณที่เป็น normal probe โดยผลลักษณะนี้พบในตัวอย่างของคนปกติ หรือ ตัวอย่างที่มีมิวเตชันชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากชนิดที่ตรวจวัดในครั้งนี้

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant		●									

**ไดอะแกรมที่ 4** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น homozygote ของ mutation ชนิด SEA จะพบจุดสีม่วงเฉพาะกับ mutant probe ของ SEA และ ไม่พบจุดสีม่วงบน normal probe ชนิดอื่นๆ เนื่องจากยีนเกิดการขาดหายไปทั้ง 4 ยีน

	THAI	SEA	CS	PS	SD	4.2	QS	3.7			
Normal	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	No.
Mutant		●									

**ไดอะแกรมที่ 5** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น heterozygote ของ mutation ชนิด SEA จะพบจุดสีม่วงทั้ง normal และ mutant probe ของ SEA ส่วน probes อื่นๆ จะพบจุดสีม่วงบริเวณ normal probe

	THAI	SEA	CS	PS	SD	4.2	QS	3.7			
Normal											No.
Mutant											













**ไดอะแกรมที่ 6** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น compound heterozygote ของ  $\alpha$ -thal1 ชนิด SEA ร่วมกับ  $\alpha$ -thal2 ชนิด Constant's Spring จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ของ SEA และพบเฉพาะ mutant probe ของ CS บนเมมเบรนส่วนมิวเตชัน ชนิด CS, PS, และ  $-\alpha^{4.2}$  ใช้ normal probe ร่วมกัน จึงทำให้ไม่พบปฏิกิริยาบริเวณ normal probe ดังกล่าว

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant											












**ไดอะแกรมที่ 7** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น heterozygote ของ  $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type I จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ทั้ง 3 จุดบนเมมเบรน

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant											












**ไดอะแกรมที่ 8** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น heterozygote ของ  $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type II จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe 2 จุดบนเมมเบรน

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7				
Normal												No.
Mutant												

**ไดอะแกรมที่ 9** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น heterozygote ของ  $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type III จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe 1 จุดบนเมมเบรน

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant											

**ไดอะแกรมที่ 10** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น compoundheterozygote ของ  $\alpha$ -thal1 ชนิด SEA ร่วมกับ  $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type I จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ของโพรบ SEA และ mutant probe ของ 3.7 ทั้ง 3 จุด

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant											

**ไดอะแกรมที่ 11** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น compound heterozygote ของ  $\alpha$ -thal1 ชนิด SEA ร่วมกับ  $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type II จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ของโพรบ SEA และ normal probe ของ 3.7 จำนวน 1 จุด mutant probe ของ 3.7 จำนวน 2 จุด

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7		
Normal	●	●	●	●	●	●	●	●	●	No.
Mutant		●							●	

**ไดอะแกรมที่ 12** แสดงการอ่านผลสำหรับตัวอย่างที่เป็น compound heterozygote ของ  $\alpha$ -thal1 ชนิด SEA ร่วมกับ  $\alpha$ -thal2 ชนิด 3.7 type III จะพบจุดสีม่วงกับทั้ง normal และ mutant probe ของโพรบ SEA และ normal probe ของ 3.7 จำนวน 2 จุด mutant probe ของ 3.7 จำนวน 1 จุด

#### 2.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้สถิติวิเคราะห์

2.2.4.1 จากการศึกษาเม็ดเลือดของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย โดยใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์เป็นจำนวน 141 ราย นำผลการตรวจดังกล่าวมาคำนวณหาค่าความถี่ของยีนที่ผิดปกติคิดเป็นร้อยละของยีนที่ศึกษาทั้งหมด

$$\text{ความถี่ของยีนแต่ละชนิด (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนอัลลีลของชนิดยีน} \times 100}{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมด}}$$

2.2.4.2 จากการศึกษาเม็ดเลือดของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย เป็นจำนวน 141 ราย จากการคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างจำนวน 139 ราย นำผลการตรวจดังกล่าวมาคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความถูกต้อง (accuracy)

		การตรวจวินิจฉัยจากวิธีมาตรฐาน	
		เป็นโรค	ไม่เป็นโรค
ผลการตรวจที่ต้องการ ตรวจสอบ	ผลบวก	True positive (a)	False positive (b)
	ผลลบ	False negative (c)	True negative (d)

$$\text{การคำนวณค่าความไว (\%)} = \frac{\text{True positive (a)} \times 100}{\text{True positive (a)} + \text{False negative (c)}}$$

$$\text{การคำนวณค่าความจำเพาะ (\%)} = \frac{\text{True negative (d)} \times 100}{\text{False positive (b)} + \text{True negative (d)}}$$

$$\text{การคำนวณค่าความถูกต้อง (\%)} = \frac{(\text{True positive (a)} + \text{True negative (d)}) \times 100}{(\text{True positive (a)} + \text{False negative (c)} + \text{False positive (b)} + \text{True negative (d)})}$$

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

##### 3.1 การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ผลการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ที่มีมารับบริการของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวนทั้งสิ้น 141 ราย เป็นชาย 54 ราย หญิง 87 ราย มีผลการตรวจ Hb typing สรุปได้ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการตรวจ Hb typing จากจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 141 ราย

ผล Hb typing	จำนวนตัวอย่าง
- A <sub>2</sub> AH	107
- A <sub>2</sub> A Bart's H	16
- CSA <sub>2</sub> AH	12
- CS A <sub>2</sub> A Bart's H	6
รวม	141

##### 3.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ที่สกัดได้

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ที่สกัดได้จากการใช้ชุดน้ำยาสกัด Genomic DNA mini kit โดยใช้เม็ดเลือดขาวจาก buffy coat จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอช จำนวนทั้งสิ้น 141 ราย โดยตรวจสอบจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm (OD<sub>260</sub>) วัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm (OD<sub>280</sub>) และวัดความบริสุทธิ์ของ DNA โดยคำนวณจากค่า OD ratio = OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> โดยค่า OD ratio ที่เหมาะสมของ DNA สำหรับนำไปใช้งานต่อ มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 ซึ่งพบว่าค่า OD ratio ของ DNA ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 1.68 - 2.33 และความเข้มข้นของ DNA มีค่าระหว่าง 10 ng/μl - 132 ng/μl นอกจากนี้ได้มีการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ โดยนำ DNA ไปทดสอบใน 1% agarose gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 9



**รูปที่ 9** ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของ DNA โดยการนำไปทดสอบใน 1% agarose gel electrophoresis

เลนที่ 1-4 คือ DNA มีปริมาณมากกว่า 20 ng/μl

เลนที่ 5-10 คือ DNA ที่มีปริมาณ 10-20 ng/μl

เลนที่ 11-15 คือ DNA ที่มีปริมาณน้อยกว่า 10 ng/μl ซึ่งจะไม่นำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ DNA น้อยกว่า 10 ng/μl มาทำการทดลองในขั้นต่อไป

### 3.3 การออกแบบ Oligonucleotide primers and probes

การออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OLIGO7 ตามคุณสมบัติที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ทำให้ได้ตำแหน่ง ค่า Tm รวมถึงความยาวของไพรเมอร์และโพรบ สรุปได้ดังตารางที่ 14 และ 15

ตารางที่ 14 ลำดับเบสและรายละเอียดคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Name	Primer's Sequence (5' -> 3')	Length <sup>a</sup>	Tm (°C)	Position <sup>b</sup>	Reference <sup>c</sup>	Mutation	PCR product sizes (bp)
SEA1F	5'-(B)-CTT CGC AGG AAC TCG GTC-3'	18	48	26187-26204	NG_00006.1	SEA deletion	N: SEA3F+SEA2R = 541 M: SEA1F+SEA2R = 389 N: SEA1F+A1B = 249
SEA2R	5'-(B)-CTC AGC CTC CCG ACT AGC-3'	18	54.9	41725-41743			
SEA3F	5'-(B)-TAG TTT GGC GGC GAC AGC -3'	18	52.6	41189-41206			
A1B	5'-GTT CCC TAG GCC CCG ACA CG -3'	20	60	26416-26436			
C2	5' -GCA CCT CTG GGT AGG TTC TC-3'	20	55.9	38724-38743	NG_00006.1	THAI deletion	M :C2+C3 = 460
C3	5'-(B) -CCC CTG ACA ATC TCA TCA CTC -3'	21	55.4	10310-1029			
CSF	5'-(B)-CTG CAC AGC TCC TAA GCC A -3'	19	53.2	34327-34345	NG_00006.1	Point mutation in exon 3 of $\alpha_2$ gene	N/M : CSF+Z = 305
Z	5'-(B)-GTA AAC ACC TCC ATT GTT GG-3'	20	49.7	34612-34631			
A	5'-CTG TCC TTT CCC TAG CCA GAG CCA-3'	24	60.8	32826-32849	NG_00006.1	3.7 kb deletion	M : A+B = 1,937 M : RT-L+B = 386
B	5'-CCA TGC CTG GCA CGC TTT GCT GAG-3'	24	62.5	38411-38434			
RT-L	5'-(B)-CTC TCA GGG CAG AGG ATC AC -3'	20	55.9	34244-34263 and 38048-38067			
E	5'-CCC TGG GTG TCC AGG AGC AAG CC-3'	23	64.2	30129-30151	NG_00006.1	4.2 kb deletion	M: G+E = 1,762 N: G+F = 228
F	5'-GGC ACA TCC GGG GAC AGA GAG AA-3'	23	60.6	30334-30356			
G	5'-(B)-CCG GTT TAC CCA TGT GGT GCC TC-3'	23	60.6	36064-36086			

B หมายถึงการติดฉลากด้วย biotin

N หมายถึง Normal

M หมายถึง Mutant

<sup>a</sup> คือ ความยาวของเส้นไพรเมอร์

<sup>b</sup> คือ ตำแหน่งของไพรเมอร์บนลำดับเบสอ้างอิง (NG\_00006.1)

<sup>c</sup> คือ ลำดับเบสอ้างอิงของ *Homo sapiens* alpha globin region

ตารางที่ 15 ลำดับเบสและรายละเอียดของโพรบที่ใช้ในการตรวจมิวเตชันบนยีนแอลฟาโกลบิน

Name	Type	Probe's Sequence (5' -> 3')	Length <sup>a</sup>	Tm (°C)	Position <sup>b</sup>	Reference <sup>c</sup>	Mutation
SEA1	N	5'-NH <sub>2</sub> -CCC ATA TCG CAC AAA GA -3'	17	44.6	26373-26388	NG_00006.1	SEA deletion
SEA	M	5'-NH <sub>2</sub> -AGG TTC ACT TGG AGG C -3'	16	45.9		NG_000006.1:g.26264_45564del19301	
SEA2	N	5'-NH <sub>2</sub> - CCA GGA GTT CCC AAG AA -3'	17	47.1	41430-41447	NG_00006.1	THAI deletion
THAI	M	5'-NH <sub>2</sub> - AGC CCT TGA GCC GCG -3'	15	50.1		NG_000006.1:g.10664_44164del33501	
JN1	N	5'- NH <sub>2</sub> - AGT GCG GCC CAG GCC -3'	15	52.9	34301-34315	NG_00006.1	3.7 kb deletion
JN2	M	5'- NH <sub>2</sub> - GGC CGA GGG CCC AGG -3'	15	55.6	38107-38121	NG_00006.1	
JN3	N	5'- NH <sub>2</sub> - AGG AGG AAC GGC TAC -3'	15	44.7	34476-34490	NG_00006.1	
JN4	M	5'- NH <sub>2</sub> - AAG AAG CAT GGC CAC -3'	15	41.9	38287-38301	NG_00006.1	
JN5	N	5'- NH <sub>2</sub> - CAG AGA GAA CCC AGG -3'	15	44.7	38397-38411	NG_00006.1	
JN6	M	5'- NH <sub>2</sub> - GGG AAA AAA CTC AGG -3'	15	39.2	34585-34599	NG_00006.1	
CSN	N	5'-NH <sub>2</sub> - TAC CGT TAA GCT GGA GCC T -3'	19	51.1	34455-34473	NG_00006.1	4.2 kb deletion
- $\alpha$ <sup>4.2</sup>	M	5'- NH <sub>2</sub> - CTG TCC CCA GTG CAA GTG -3'	18	52.6	34930-34947	NG_00006.1	
CSN	N	5'-NH <sub>2</sub> - TAC CGT TAA GCT GGA GCC T -3'	19	51.1	34455-34473	NG_00006.1	Hb CS
CSM	M	5'-NH <sub>2</sub> - TAC CGT CAA GCT GGA GCC T -3'	19	53.2	34930-34947	$\alpha_2$ cd142 TAA->CAA	
CSN	N	5'-NH <sub>2</sub> - TAC CGT TAA GCT GGA GCC T -3'	19	51.1	34455-34473	NG_00006.1	Hb PS
PSM	M	5'-NH <sub>2</sub> - TAC CGT TAT GCT GGA GCC T -3'	19	51.1	34455-34473	$\alpha_2$ cd142 TAA->TAT	
QSN	N	5'-NH <sub>2</sub> - ACC GTG CTG ACC TCC A -3'	16	48.5	34437-34452	NG_00006.1	Hb QS
QSM	M	5'-NH <sub>2</sub> - ACC GTG CCG ACC TCC A -3'	16	51.1	34437-34452	$\alpha_2$ cd125 CTG->CCG	



ตารางที่ 15 (ต่อ)

Name	Type	Probe's Sequence (5' -> 3')	Length <sup>a</sup>	Tm (°C)	Position <sup>b</sup>	Reference <sup>c</sup>	Mutation
SDN	N	5'-NH <sub>2</sub> - ACT GCC TGC TGG TGA C -3'	16	48.5	34345-34360	NG_00006.1	Hb SD
SDM	M	5'-NH <sub>2</sub> - ACT GCC TGC GGG TGA C -3'	16	51.1	34345-34360	$\alpha_2$ cd109 CTG->CGG	

N =Normal, M =Mutant

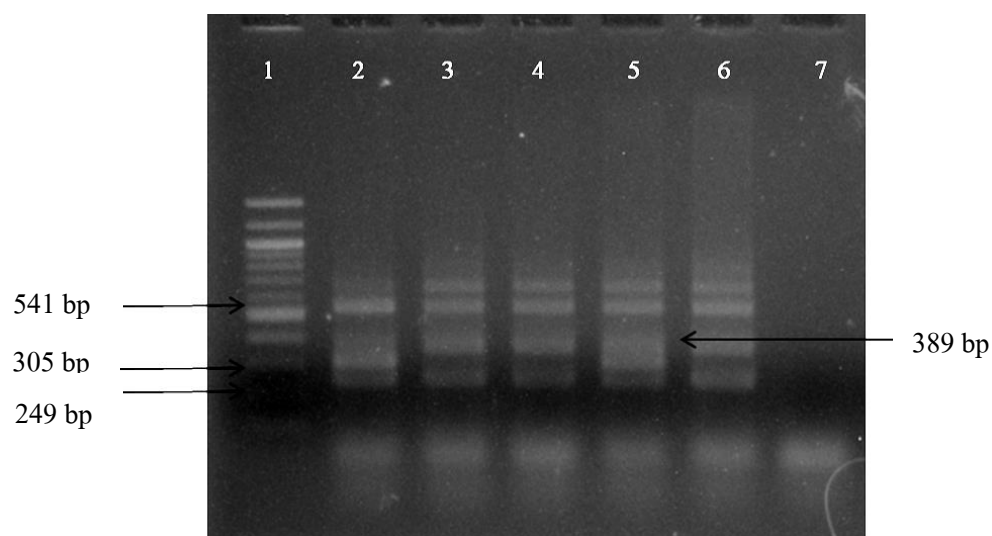
<sup>a</sup> คือ ความยาวของเส้นโพรบ

<sup>b</sup> คือ ตำแหน่งของโพรบบนลำดับเบสอ้างอิง (NG\_00006.1)

<sup>c</sup> คือ ลำดับเบสอ้างอิงของ *Homo sapiens* alpha globin region และ ฐานข้อมูล [http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query\\_vars3](http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3)

### 3.4 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.4.1 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี multiplex gap-PCR ใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 ไพรเมอร์ โดยแบ่งเป็น ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนอัลลีลปกติ (normal allele) ได้แก่ SEA 1F กับ SEA 3F, SEA1F กับ A1B, และ CSF กับ Z ซึ่งจะได้ PCR product ที่มีขนาด 541 bp, 249 bp, และ 305 bp ตามลำดับ และไพรเมอร์ที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เกิดการขาดหายไปของยีน (mutant allele) ได้แก่ SEA 1F กับ SEA 2R, และ C2 กับ C3 ซึ่งจะได้ PCR product ที่มีขนาด 389 bp และ 460 bp ตามลำดับ



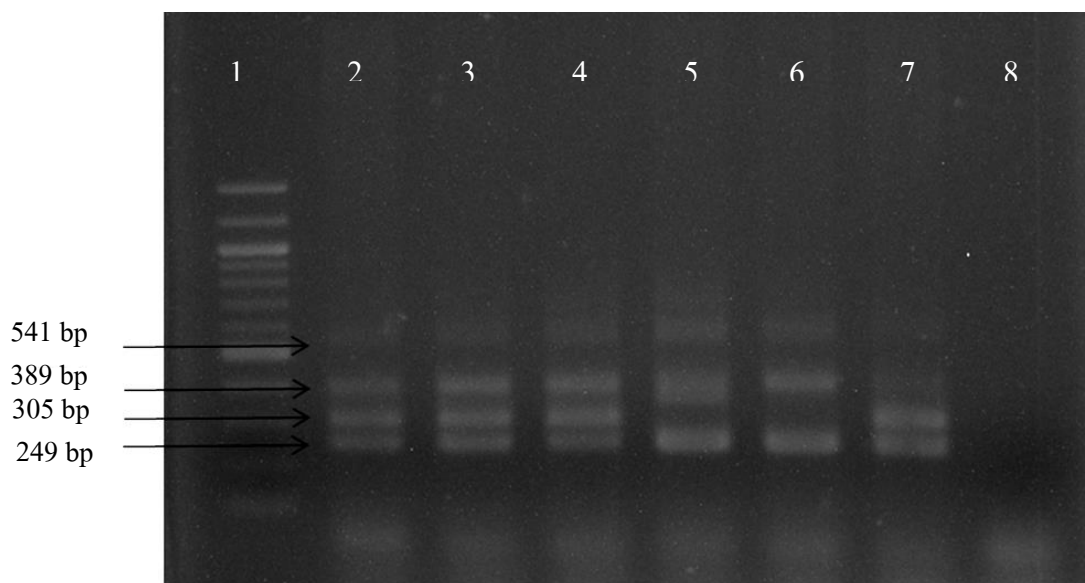
**รูปที่ 10 A** PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีนแอลฟาไกลบิน ใช้ไพรเมอร์ทั้ง 8 เส้น คือ SEA1F, SEA2R, SEA3F, A1B, C2, C3, CSF, และ Z โดย

เลนที่ 1 คือ marker 100 bp

เลนที่ 2 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากคนปกติ ซึ่งพบ PCR product ขนาด 541 bp, 249 bp, และ 305 bp

เลนที่ 3-6 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชพบ PCR product ขนาด 541 bp, 249 bp, 305 bp, และ 389 bp

เลนที่ 7 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของน้ำ (Blank)



**รูปที่ 10 B** PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีนแอลฟาโกลบิน ใช้ไพรเมอร์ทั้ง 8 เส้น คือ SEA1F, SEA2R, SEA3F, A1B, C2, C3, CSF, และ Z โดย

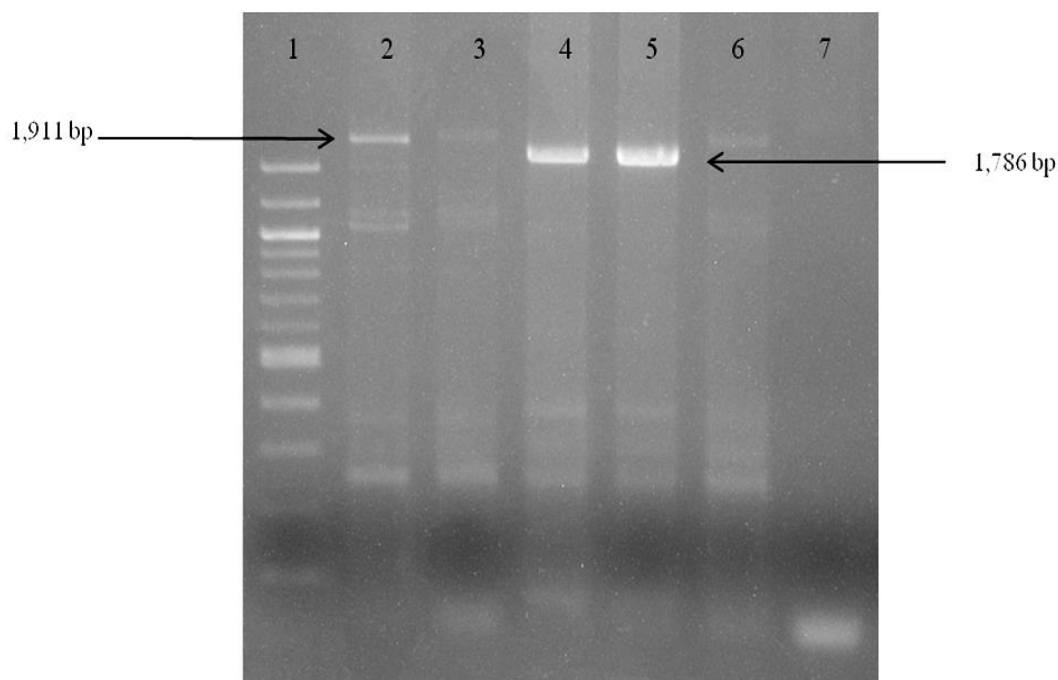
เลนที่ 1 คือ marker 100 bp

เลนที่ 2 - 4 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด non-deletion ซึ่งพบ PCR product ขนาด 541 bp, 249 bp, 305 bp, และ 389 bp

เลนที่ 5 - 7 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด gene deletion ซึ่งพบ PCR product ขนาด 541 bp, 249 bp, และ 389 bp

เลนที่ 8 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของน้ำ (Blank)

3.2.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี nested-PCR สำหรับตรวจความผิดปกติของ  
แอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 3.7-kb deletion



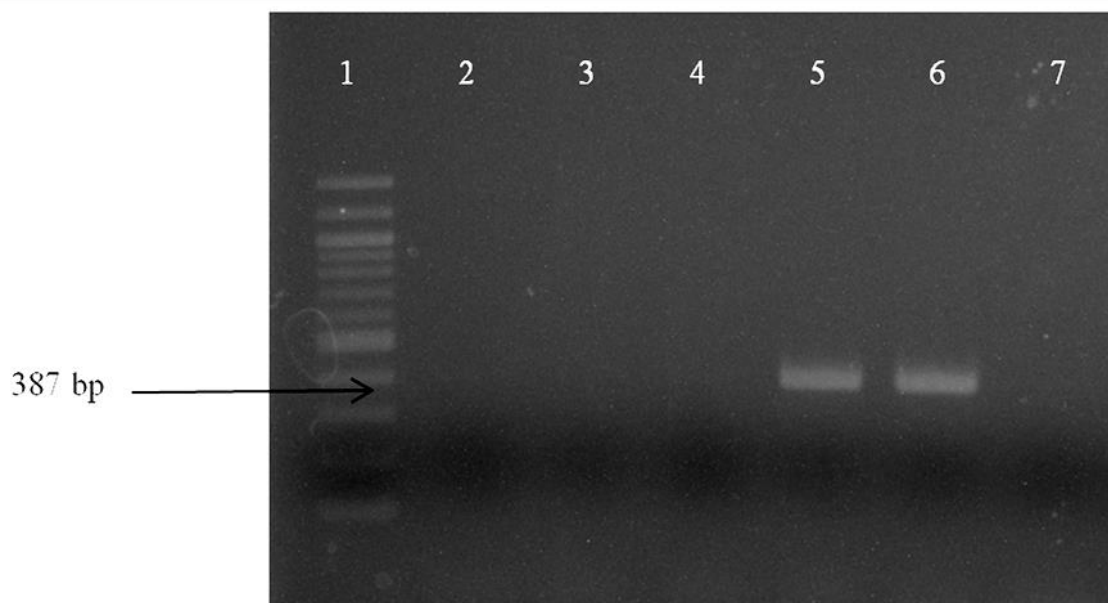
**รูปที่ 11A** แสดงผล PCR product จากไพรเมอร์คู่แรก (A, B, และ Z) ของการ  
ตรวจความผิดปกติของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 3.7 kb-deletion

เลนที่ 1 คือ marker 100 bp

เลนที่ 2, 3 และ 6 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือด  
จากคนปกติ ซึ่งพบ PCR product ขนาด 1,911 bp

เลนที่ 4 และ 5 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจาก  
ผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด 3.7 kb-deletion ซึ่งพบ PCR product ขนาด 1,786  
bp

เลนที่ 6 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของน้ำ (Blank)



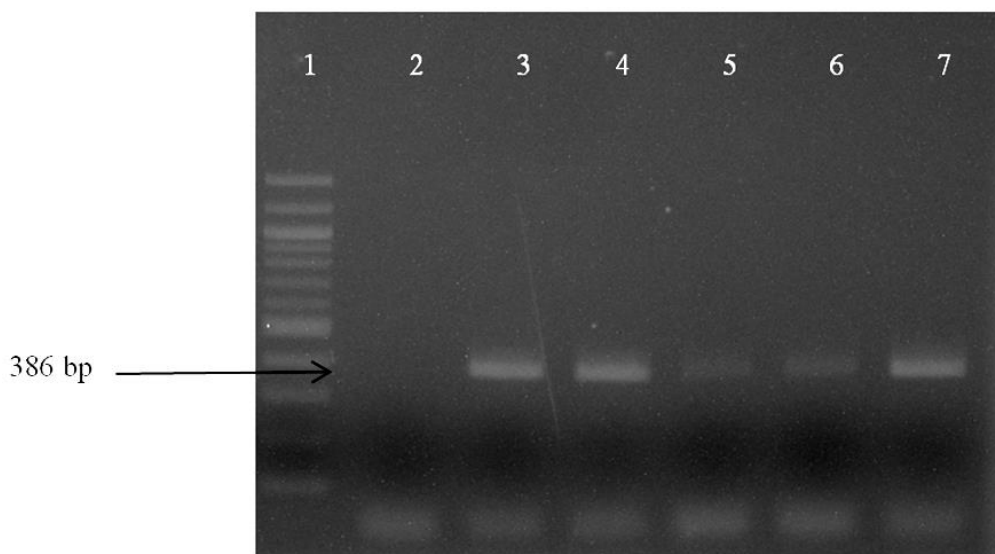
**รูปที่ 11B** แสดงผล PCR product จากไพรเมอร์คู่ที่ 2 (RT-L และ Z) ของยีนแอลฟาไกลบิน สำหรับ normal probe โดย

เลนที่ 1 คือ marker 100 bp

เลนที่ 2 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของน้ำ (Blank)

เลนที่ 3, 4 และ 7 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย โรคฮีโมโกลบินเอชชนิด gene deletion

เลนที่ 5 และ 6 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากคนปกติ ซึ่งพบ PCR product ขนาด 387 bp



**รูปที่ 11C** แสดงผล PCR product จากไพรเมอร์คู่ที่ 2 (RT-L และ B) ของยีน แอลฟาไกลบินสำหรับ mutant probe โดย

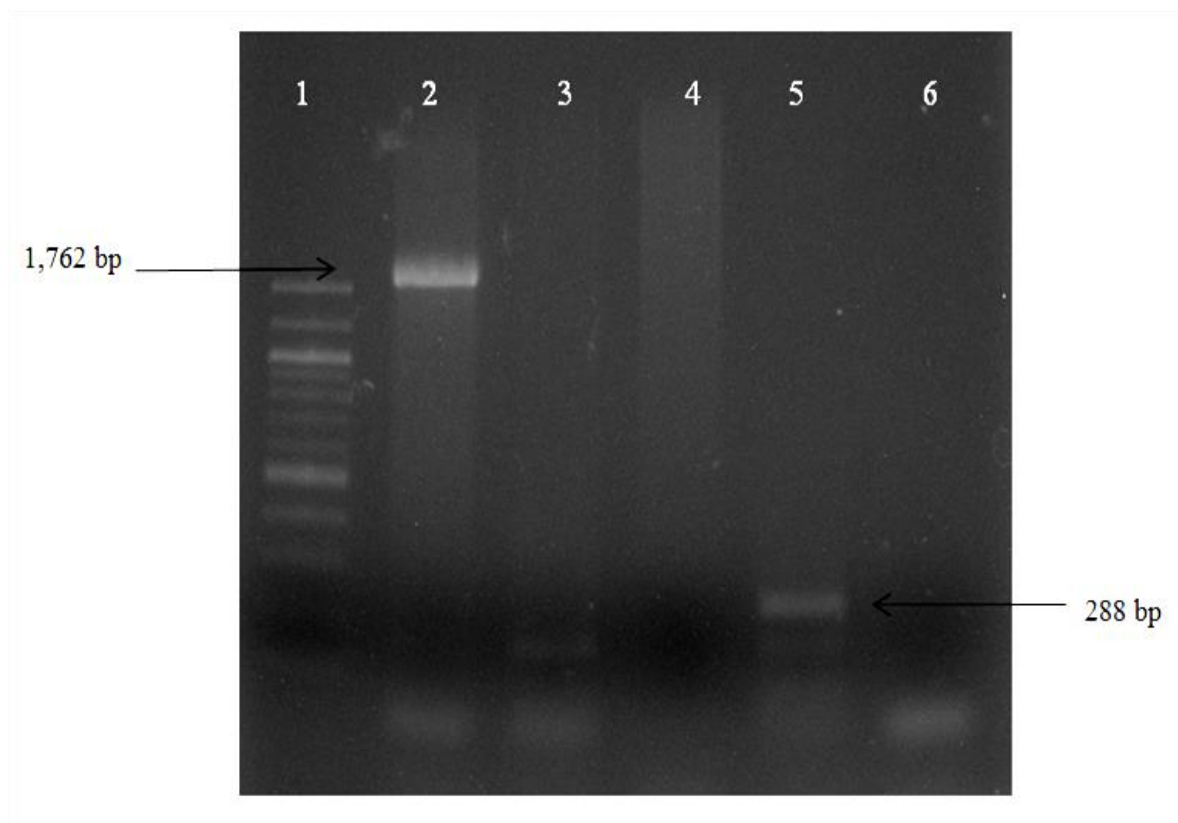
เลนที่ 1 คือ marker 100 bp

เลนที่ 2 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของน้ำ (Blank)

เลนที่ 3, 4 และ 7 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด gene deletion ซึ่งพบผลผลิต PCR ขนาด 386 bp

เลนที่ 5 และ 6 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากคนปกติ

### 3.2.3 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี multiplex gap-PCR สำหรับการตรวจความผิดปกติของ แอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 4.2-kb deletion



รูปที่ 12 แสดงผล PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA แอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 4.2 kb-deletion

เลนที่ 1 คือ marker 100 bp

เลนที่ 2 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด SEA ร่วมกับ 4.2 kb deletion ซึ่งพบ PCR product ขนาด 1,726 bp

เลนที่ 3 - 5 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่ชนิด 4.2 kb deletion ซึ่งพบ PCR product ขนาด 288 bp

เลนที่ 6 คือ PCR product จากการเพิ่มจำนวน DNA ของน้ำ (Blank)

### 3.5 การตรวจหาชนิดมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยวิธี reverse dot blot hybridization

วิธี reverse dot blot hybridization เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาชนิดมิวเตชันชนิดที่ทราบตำแหน่ง (known mutation) ซึ่งสามารถตรวจหาชนิดมิวเตชันได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยนำ oligonucleotide probe ที่จำเพาะต่อมิวเตชันแต่ละชนิดมาตรึงลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วนำ PCR product ของผู้ป่วยที่มีการติดฉลากด้วย biotin มาทำปฏิกิริยากับ probe หลังจากนั้นตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ enzymatic color-detection

การศึกษาที่ผ่านมาทราบว่า แอลฟาธาลัสซีเมียที่พบได้ในภาคใต้ของประเทศไทยได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมีย1 ชนิดยื่นขาดหายไป 19.3 กิโลเบส (SEA deletion) ชนิดยื่นขาดหายไป 19 กิโลเบส (THAI deletion) ส่วนแอลฟาธาลัสซีเมีย2 ได้แก่ ชนิดยื่นขาดหายไป 3.7 และชนิดยื่นขาดหายไป 4.2 กิโลเบส ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ) (Winichagoon *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบแอลฟาธาลัสซีเมีย2 ชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการขาดหายไปของยีนเช่น ฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงส์ ( $\alpha^{CS}\alpha$ ) ฮีโมโกลบินปากเซ ( $\alpha^{PS}\alpha$ ) ฮีโมโกลบินกวางซี ( $\alpha^{QS}\alpha$ ) และฮีโมโกลบินสวนดอก ( $\alpha^{SD}\alpha$ ) (Laosombat *et al.*, 2009) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงได้เลือก probe 10 probes ที่จำเพาะต่อมิวเตชัน 8 ชนิด ซึ่งครอบคลุมแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ คือ SEA deletion, THAI deletion, 3.7-kb deletion type I, 3.7-kb deletion type II, 3.7-kb deletion type III, 4.2-kb deletion และ point mutation ได้แก่ฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงส์ ( $\alpha^{CS}\alpha$ ) ฮีโมโกลบินปากเซ ( $\alpha^{PS}\alpha$ ) ฮีโมโกลบินกวางซี ( $\alpha^{QS}\alpha$ ) และฮีโมโกลบินสวนดอก ( $\alpha^{SD}\alpha$ ) รูปที่ 13 - 21 แสดงผลการตรวจหาชนิดมิวเตชันของผู้ป่วยที่มารับการตรวจคัดกรองที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์จำนวน 141 รายพบว่ารูปแบบของชนิดมิวเตชันที่พบมี 3 รูปแบบ คือ SEA deletion/3.7-kb deletion, SEA deletion/ $\alpha^{CS}\alpha$ , และ SEA deletion/ $\alpha^{QS}\alpha$



ผลการตรวจชนิดมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมีย ด้วยวิธี reverse dot blot hybridization ซึ่งใช้ ASO probe 10 probes ที่จำเพาะต่อมิวเตชัน 8 ชนิด

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	No.
Mutant	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

รูปที่ 13 ผล hybridization ของคนปกติ ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	No.
Mutant	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-

รูปที่ 14 ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ชนิด -SEA/ $\alpha^{3.7I}$  ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้นชุด probe ของ - $\alpha^{3.7}$  และพบจุดสีม่วงในแถว mutant คือ SEA และ ชุด - $\alpha^{3.7}$  ทั้ง 3 จุด

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	No.
Mutant	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-

รูปที่ 15 ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ชนิด -SEA/ $\alpha^{3.7II}$  ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้นชุด probe ของ - $\alpha^{3.7}$  จำนวน 2 probe และพบจุดสีม่วงในแถว mutant คือ SEA และ ชุด - $\alpha^{3.7}$  จำนวน 2 จุดสุดท้าย

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7		
Normal										No.
Mutant										

รูปที่ 16 ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ชนิด -SEA/ $\alpha^{3.7III}$  ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้นชุด probe ของ  $\alpha^{3.7}$  จำนวน 1 probe และพบจุดสีม่วงในแถว mutant คือ SEA และ ชุด  $\alpha^{3.7}$  จำนวน 1 probe ชุดท้าย

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7		
Normal										No.
Mutant										

รูปที่ 17 ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด -SEA/ $\alpha^{4.2}$  ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ในแถว normal เฉพาะ THAI และ SEA และพบจุดสีม่วงในแถว mutant เฉพาะ probe SEA และ  $\alpha^{4.2}$

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant											

รูปที่ 18 ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด -SEA/ $\alpha^{CS}$  ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้น probe CS PS และ  $\alpha^{4.2}$  สำหรับในแถว mutant พบจุดสีม่วงกับ probe SEA และ CS

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant											

รูปที่ 19 ผล hybridization ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด -SEA/  $\alpha\alpha^{OS}$  ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal ยกเว้น probe QS

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant											

รูปที่ 20 ผล hybridization ของผู้ที่เป็นพาหะของแอลฟาซาล์ซีเมียชนิดยีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ชนิดย่อย 1 ( $\alpha\alpha/\alpha^{3.7-1}$ ) ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal และ mutant probe ของ 3.7 ทั้ง 3 probes

	THAI	SEA	CS	PS	SD	QS	4.2	3.7			
Normal											No.
Mutant											

รูปที่ 21 ผล hybridization ของผู้ที่เป็นพาหะของแอลฟาซาล์ซีเมียชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง ( $\alpha\alpha/\alpha^{CS}\alpha$ ) ซึ่งพบจุดสีม่วงกับ probe ทุกชนิดในแถว normal และ mutant probe ของคอนสแตนต์สปริง (CS)

### 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติวิเคราะห์

#### 3.6.1 การคำนวณความถี่ของมิวเตชันแต่ละชนิด

จากการศึกษาพบว่าในจำนวนของผู้ป่วยที่มารับการตรวจคัดกรองที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์จำนวน 141 ราย ตรวจพบรูปแบบของชนิดมิวเตชันได้ 3 รูปแบบ คือ SEA deletion/3.7-kb deletion, SEA deletion/ $\alpha^{CS}\alpha$ , และ SEA deletion/ $\alpha^{QS}\alpha$  นำผลการตรวจดังกล่าวมาคำนวณค่าความถี่ของยีนที่ผิดปกติคิดเป็นร้อยละของยีนที่ศึกษาทั้งหมด ซึ่งจำนวนของผู้ป่วยและร้อยละของมิวเตชันแต่ละชนิดสรุปได้ดังตารางที่ 16

$$\text{ความถี่ของชนิดมิวเตชัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนอัลลีลของชนิดมิวเตชัน}}{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมด}} \times 100$$

ตารางที่ 16 จำนวนของผู้ป่วยและร้อยละของมิวเตชันแต่ละชนิดที่ตรวจพบ

$\alpha$ -globin gene genotype	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	ร้อยละของผู้ป่วย(%)
Deletional Hb H disease		
● SEA deletion/3.7-kb deletion	110	78.02
○ SEA deletion/3.7-kb deletion type I (-SEA/ $-\alpha^{3.7I}$ )	93	65.97
○ SEA deletion/3.7-kb deletion type II (-SEA/ $-\alpha^{3.7II}$ )	13	9.22
○ SEA deletion/3.7-kb deletion type III (-SEA/ $-\alpha^{3.7III}$ )	4	2.83
Non-deletional Hb H disease		
● SEA deletion/ $\alpha^{CS}\alpha$ (-SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$ )	30	21.27
● SEA deletion/ $\alpha^{QS}\alpha$ (-SEA/ $\alpha^{QS}\alpha$ )	1	0.71
Total	141	100.00

3.6.2 การคำนวณค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความถูกต้อง (accuracy)

จากการศึกษามิวเตชันของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียจำนวน 141 ราย นำผลการตรวจดังกล่าวมาคำนวณหาความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

		การตรวจวินิจฉัยจากวิธีมาตรฐาน	
		เป็นโรค (ราย)	ไม่เป็นโรค (ราย)
ผลการตรวจที่ต้องการ ตรวจสอบ	ผลบวก	True positive (141)	False positive (0)
	ผลลบ	False negative (0)	True negative (20)

$$\text{การคำนวณค่าความไว} = \frac{\text{True positive} \times 100}{(\text{True positive} + \text{False negative})}$$

$$= \frac{141 \times 100}{(141+0)}$$

$$= 100$$

$$\text{การคำนวณค่าความจำเพาะ} = \frac{\text{True negative} \times 100}{(\text{False positive} + \text{True negative})}$$

$$= \frac{20 \times 100}{(20+0)}$$

$$= 100$$

$$\text{การคำนวณค่าความถูกต้อง} = \frac{(\text{True positive} + \text{True negative}) \times 100}{(\text{True positive} + \text{False negative} + \text{False positive} + \text{True negative})}$$

$$= \frac{(140+20) \times 100}{(140+0+0+20)}$$

$$= 100$$

## บทที่ 4

### บทวิจารณ์ผลการวิจัย

โรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) เป็นแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดหนึ่ง เกิดจากปฏิสัมพันธ์ของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>1</sup> กับแอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>2</sup> ทำให้มียีนแอลฟาโกลบินเพียง 1 ยีนที่สามารถผลิตเส้นโปรตีนแอลฟาโกลบินปกติได้ (Chui *et al.*, 2003) ทำให้อัตราการสร้างสายโกลบินลดลง ส่งผลให้ตรวจพบฮีโมโกลบินเอช (Hb H) ในผู้ป่วย ซึ่ง Hb H เกิดจากการจับกันเองของสายเบต้าโกลบิน ( $\beta_4$ ) สาเหตุที่การสร้างสายแอลฟาโกลบินลดลงเกิดจากมิวเตชันของยีน ทั้งแบบการขาดหายไปของยีนขนาดหลายกิโลเบส (large deletion mutation) หรือเกิดจากมิวเตชันเฉพาะจุด (point mutation) ที่ทำให้สร้างโปรตีนได้ลดลง หรือสายโปรตีนที่ได้ไม่มีความเสถียร (unstable Hb) (Leung *et al.*, 2008)

จากการศึกษาในอดีตพบว่าชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมียมีความสัมพันธ์กับกลุ่มประชากร กล่าวคือ รูปแบบของมิวเตชันมีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร (Harteveld and Higgs, 2010) ตัวอย่างเช่น ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะพบมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>1</sup> ชนิด SEA ซึ่งเกิดจาก gene deletion ขนาด 19.3 kb ในขณะที่บริเวณเมดิเตอร์เรเนียนจะพบมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>1</sup> ชนิด MED ซึ่งเกิดจาก gene deletion ขนาด 18 kb โดยมิวเตชันทั้งสองชนิดนี้ทำให้ยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปทั้งสองยีน ทำให้ไม่มีการสร้างสายโปรตีนโกลบินจากโครโมโซมข้างนั้น สำหรับแอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>2</sup> สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะมิวเตชัน คือ การขาดหายไปของยีนและมิวเตชันเฉพาะจุด โดยการขาดหายไปของยีน ชนิดที่พบในเมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออกกลาง อินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงแอฟริกาและอเมริกา คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>2</sup> ชนิด gene deletion ขนาด 3.7 kb และ แอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>2</sup> ที่พบได้บ่อยบริเวณปาปัวนิวกินีคือ แอลฟาธาลัสซีเมีย<sup>2</sup> ชนิด gene deletion ขนาด 4.2 kb ส่วนมิวเตชันเฉพาะจุดที่มีการรายงานในฐานะข้อมูลมีถึง 400 ชนิด (Globin gene server : [http://globin.bx.psu.edu/cgi-in/hbvar/query\\_vars3](http://globin.bx.psu.edu/cgi-in/hbvar/query_vars3)) สำหรับมิวเตชันเฉพาะจุดที่มีรายงานในประเทศไทยได้แก่ Hb Suan-Dok, Hb Quong Sze, Hb Constant Spring (Hb CS) และ Hb Paksé (Hb PS) (Fucharoen and Winichagoon, 2011)

จากความแตกต่างของมิวเตชันในแต่ละภูมิภาค ทำให้รูปแบบของยีนที่ทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอชมีความแตกต่างกัน จากการศึกษานในประเทศไทยพบว่ารูปแบบของมิวเตชันมีความคล้ายคลึงกัน แต่ความถี่ของมิวเตชันแต่ละชนิดแตกต่างกันไป โดยในภาคใต้พบว่ามิวเตชันใน

รูปแบบที่ยีนเกิดการขาดหายไปทั้ง 3 ยีน (deletional Hb H disease) มีความถี่มากที่สุด (Loasombat *et al.*, 2009) ในขณะที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางมีความถี่ของการขาดหายไปของยีน 2 ยีน ร่วมกับมิวเตชันเฉพาะจุด (non-deletional Hb H disease) มากกว่า (Boonsa *et al.*, 2004; Charoenkwhan *et al.*, 2005; Fuchareon, 2011)

จากการตรวจหาชนิดมิวเตชันของยีนแอลฟาโกลบินในผู้ป่วยโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอชด้วยวิธี PCR และ reverse dot blot hybridization ในครั้งนี้ ตรวจพบรูปแบบของมิวเตชันได้ 3 รูปแบบ คือ SEA deletion/3.7-kb deletion, SEA deletion/ $\alpha^{CS} \alpha$ , และ SEA deletion/ $\alpha^{OS} \alpha$  เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ารูปแบบมิวเตชันที่พบในการศึกษานี้มีจำนวนน้อยกว่าการศึกษาของ Loasombat และคณะ ในปี 2009 ซึ่งความถี่และชนิดของ Hb H disease แต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบความถี่และชนิดของมิวเตชันของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอชในประเทศไทย จากการศึกษาในครั้งนี และการศึกษาของ Loasombat และคณะ (Loasombat *et al.*, 2009)

$\alpha$ -globin gene genotype	The percentage of patients	
	Present study	Loasombat <i>et al.</i> , 2009
<b>Deletional HbH disease</b>		
SEA deletion/3.7-kb deletion	78.02	51.0
SEA deletion/3.7-kb deletion type I (-SEA/- $\alpha^{3.7 I}$ )	65.97	ND
SEA deletion/3.7-kb deletion type II (-SEA/- $\alpha^{3.7 II}$ )	9.22	ND
SEA deletion/3.7-kb deletion type III (-SEA/- $\alpha^{3.7 III}$ )	2.83	ND
SEA deletion/4.2-kb deletion	0	4.8
THAI deletion/3.7-kb deletion	0	0.7

หมายเหตุ ND คือ not detect หรือ ไม่ได้มีการศึกษา

ตารางที่ 17 (ต่อ)

$\alpha$ -globin gene genotype	The percentage of patients	
	Present study	Loasombat <i>et al.</i> , 2009
<b>Non-deletional Hb H disease</b>		
SEA deletion/ $\alpha^{CS}\alpha$	21.27	37.4
SEA deletion/ $\alpha^{PS}\alpha$	0	2.7
THAI deletion/ $\alpha^{CS}\alpha$	0	1.4
SEA deletion/ $\alpha^{QS}\alpha$	0.71	1.4
SEA deletion/ $\alpha^{Poly A}\alpha$	ND	0.7

หมายเหตุ ND คือ not detect หรือ ไม่ได้มีการศึกษา

จากตารางสรุปได้ว่า รูปแบบของมิวเตชันที่พบมากในภาคใต้ คือ SEA deletion/3.7-kb deletion ทั้งจากการศึกษาของ Loasombat และคณะ (ร้อยละ 51.0) และการศึกษาในครั้งนี้ (ร้อยละ 78.02) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มีการแยกชนิดย่อยของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด 3.7-kb deletion โดยชนิดย่อยที่พบมากที่สุดคือ  $-\alpha^{3.7 I}$  มีความถี่ร้อยละ 65.97 รองลงมา คือ  $-\alpha^{3.7 II}$  มีความถี่ร้อยละ 9.22 และ ชนิด  $\alpha^{3.7 III}$  มีความถี่ร้อยละ 2.83 ความถี่ของมิวเตชันแบบ SEA deletion/ $\alpha^{CS}\alpha$  พบร้อยละ 21.27 ในการศึกษาของ Loasombat และคณะ พบความถี่ของมิวเตชันเฉพาะจุดมากกว่า คือ พบร้อยละ 45.10 ซึ่งสาเหตุที่พบมิวเตชันเฉพาะจุดมากกว่า อาจเป็นเพราะ ภูมิถิ่นอาศัยของกลุ่มตัวอย่างมีความแตกต่างกัน จากการทดลองของ Loasombat และคณะ ใช้กลุ่มตัวอย่างจากทั้งโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และจากโรงพยาบาลอื่น ๆ ในภาคใต้ และตัวอย่างบางส่วนจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่การศึกษาในครั้งนี้กลุ่มตัวอย่างได้จากผู้ป่วยที่มารับการตรวจคัดกรองที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์เท่านั้น ทั้งนี้เพราะมิวเตชันเฉพาะจุดบนยีนแอลฟาธาลัสซีเมียพบในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีมากกว่าในภาคใต้ของประเทศไทย (Fuchareon *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาในครั้งนี้ ไม่พบมิวเตชันรูปแบบ THAI deletion/3.7-kb deletion, SEA deletion/ $\alpha^{PS}\alpha$ , และ THAI deletion/ $\alpha^{CS}\alpha$  ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด THAI deletion พบได้น้อยมากในประเทศไทย เมื่อเทียบกับแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด SEA โดยสัดส่วนที่พบ SEA deletion : THAI deletion = 99 : 1 (Fuchareon and Viprakasit, 2009)

ผู้ป่วย deletional Hb H disease ส่วนใหญ่มีอาการของโรคที่ไม่รุนแรง อาจมีอาการตาเหลืองเล็กน้อย (mild icteric sclera) มีรูปหน้าและการเจริญเติบโตปกติ แต่อาจมีอาการซีดเมื่อเกิด



การติดเชื้อหรืออักเสบหรือได้รับยาบางชนิดแล้วกระตุ้นให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (Winichagoon, 1998) ผลตรวจเลือดพบว่า Hb และ Hct มีค่าลดลง (Higgs, 2009) สำหรับผู้ป่วยผู้ใหญ่ มักมีความรุนแรงของโรคน้อยถึงปานกลาง มีค่าฮีโมโกลบินเฉลี่ย 8.6 g/dl ค่า MCV และ MCH มีค่าลดลงกว่าปกติ ซึ่งโดยปกติแล้วผู้ป่วยไม่มีความจำเป็นต้องรักษาโดยการรับเลือด (blood transfusion therapy) ส่วนผู้ป่วย non-deletional Hb H disease จะมีอาการทางคลินิกรุนแรงกว่าชนิด deletional Hb H disease กล่าวคือ ผู้ป่วยทารกแรกเกิดมีค่าฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต MCV และ MCH ต่ำกว่าปกติ และมีโอกาสชีดหลังจากเป็นไขได้มากกว่า อาจมีตับและม้ามโตได้ รูปหน้าผิดปกติแบบชาลัสซีเมีย (thalassemic facies) มีภาวะดีซ่านที่เห็นชัดกว่า และนอกจากนี้พบว่าอายุเฉลี่ยในการเริ่มรับการรักษาด้วยการรับเลือดน้อยกว่าทารก deletional Hb H disease (Fuchareon, 2009; Loasombat, 2009; Winichagoon, 1998) สาเหตุที่ Hb H disease ชนิดนี้มีอาการทางคลินิกที่รุนแรงกว่า สันนิฐานว่าสายโกลบินที่สร้างได้มีความผิดปกติ และไม่สามารถจับกันเป็นโมเลกุลของฮีโมโกลบินปกติได้ ( $\alpha_2\beta_2$ ) จึงเกิดการตกตะกอนของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวแก่ (erythrocyte) ได้ จึงถูกทำลายในไขกระดูกและม้าม

จากการนำปริมาณ Hb H และค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยของผู้ป่วยมาคัดแยกตามรูปแบบมิวเตชัน ดังแสดงได้ดังตารางที่ 18 พบว่า ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยในผู้ป่วย non-deletional Hb H disease มีปริมาณฮีโมโกลบินเอช และค่า Hb, Hct และ MCV มีค่าน้อยกว่าผู้ป่วย deletional Hb H disease ทำให้อาการทางคลินิกของผู้ป่วย non-deletional Hb H disease มีความรุนแรงมากกว่า

นอกจากนั้นปริมาณ Hb CS เฉลี่ยที่พบในผู้ป่วย Hb H disease ชนิด -SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$  เท่ากับร้อยละ 1.7 โดยพบว่าผู้ป่วยบางรายตรวจไม่พบ Hb CS ในขั้นตอน Hb Typing ทั้งนี้เป็นเพราะ Hb CS เป็นฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร สลายตัวได้ง่ายทำให้ตรวจไม่พบในเลือดของผู้ป่วยบางราย

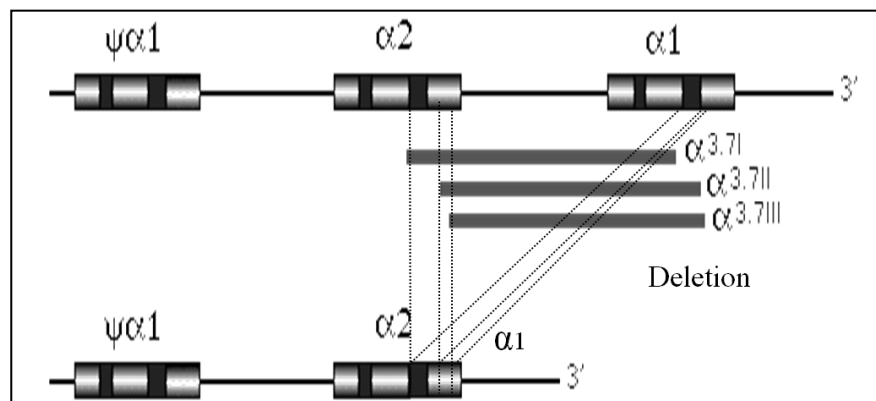
ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบปริมาณ Hb และค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยของมิวเตชันแต่ละชนิด

Type	จำนวนตัวอย่าง (ราย)	Hb H (%)			Hb CS (%)			Average CBC		
		Min	Max	Average	Min	Max	Average	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)
Deletional HbH disease										
-SEA/ $-\alpha^{3.7I}$	94	2.6	28.0	9.4	-	-	-	8.35	27.94	60.54
-SEA/ $-\alpha^{3.7II}$	12	2.4	14.8	6.5	-	-	-	8.16	27.00	60.00
-SEA/ $-\alpha^{3.7III}$	4	2.3	6.3	3.9	-	-	-	8.95	27.40	51.47

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Type	จำนวน ตัวอย่าง (ราย)	Hb H (%)			Hb CS (%)			Average CBC		
		Min	Max	Average	Min	Max	Average	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)
Non-deletional HbH disease - SEA / $\alpha^{CS}\alpha$	30	3.2	27.7	13.4	0.8	3.4	1.7	7.97	24.2	54.0

จากตารางที่ 18 พบว่า ปริมาณ Hb H เฉลี่ยในผู้ป่วย deletional Hb H disease ในแต่ละกลุ่มย่อยมีความแตกต่างกันกล่าวคือ ผู้ป่วย Hb H ชนิด - SEA /  $\alpha^{3.7 I}$  มีปริมาณ Hb H เฉลี่ยมากที่สุดคือ ร้อยละ 9.3 รองลงมาคือผู้ป่วย Hb H ชนิด - SEA /  $\alpha^{3.7 II}$  มีปริมาณ Hb H เฉลี่ยร้อยละ 6.5 และผู้ป่วย Hb H ชนิด - SEA /  $\alpha^{3.7 III}$  มีปริมาณ Hb H เฉลี่ยร้อยละ 3.9 สาเหตุที่ผู้ป่วย Hb H ชนิด - SEA /  $\alpha^{3.7 I}$  มีปริมาณ Hb H เฉลี่ยมากที่สุดเป็นไปได้ว่า เมื่อโครโมโซมเกิดการ recombination ส่งผลให้บริเวณ exon 3 ของ  $\alpha_2$ -globin gene ขาดหายไปมากกว่าใน  $\alpha^{3.7 II}$  และ  $\alpha^{3.7 III}$  ทำให้การสร้างสายแอลฟาโกลบินเกิดน้อยกว่า ส่งผลให้พบปริมาณ Hb H มากกว่า ทั้งนี้เพราะ  $\alpha_2$ -globin gene สามารถแสดงออกได้เป็น 3 เท่าของ  $\alpha_1$ -globin gene (Fucharoen and Viprakasit, 2009) โดยตำแหน่งการขาดหายไปของยีน ชนิด  $\alpha^{3.7 I}$ ,  $\alpha^{3.7 II}$  และ  $\alpha^{3.7 III}$  แสดงอยู่ในรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงการเกิด gene deletion บริเวณ x box ของ  $\alpha_2$ -globin gene ส่งผลให้เกิด  $\alpha^{3.7 I}$ ,  $\alpha^{3.7 II}$  และ  $\alpha^{3.7 III}$  (ดัดแปลงจาก Nopparattana *et al.*, 2013)

นอกจากนี้ยังมีรายงานแสดงการเปรียบเทียบปริมาณ Hb H ในผู้ป่วย deletional HbH disease และ non-deletional HbH disease พบว่าผู้ป่วยผู้ป่วย non-deletional Hb H disease มีปริมาณ Hb H สูงกว่าผู้ป่วย deletional Hb H disease (Chao *et al.*, 2014) ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ ได้มีการเปรียบเทียบปริมาณ Hb H (%) ในเลือดของผู้ป่วยอายุ 1 ปีขึ้นไป สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 19 โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณ Hb H ในผู้ป่วย deletional HbH disease เท่ากับ 8.57 และปริมาณ Hb H ในผู้ป่วย non-deletional Hb H disease เท่ากับ 13.02 ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value เท่ากับ 0.007

**ตารางที่ 19** เปรียบเทียบปริมาณฮีโมโกลบินเอช (%) ในเลือดของผู้ป่วยตั้งแต่อายุ 1 ปีขึ้นไปแยกตามชนิดของโรคฮีโมโกลบินเอช

	Deletional Hb H	Non-deletional Hb H	p-value
Hb H (%)			
Minimum value	0.7	1.8	
Maximum value	28	27.7	0.007742
Average values	8.57	13.02	

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการสำหรับตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียถือว่าเป็นการวิเคราะห์ที่มีความไวและความจำเพาะสูง การที่จะเลือกใช้วิธีใดในการวิเคราะห์ DNA นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของมิวเตชันที่พบบ่อยในแต่ละพื้นที่ และความเชี่ยวชาญของผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

สำหรับวิธี reverse dot blot hybridization ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจหามิวเตชันหลายชนิดในการทำปฏิกิริยาหนึ่งครั้ง ซึ่งได้มีการนำมาใช้กับเบต้าธาลัสซีเมียอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเบต้าธาลัสซีเมียส่วนมากเกิดจาก point mutation (Galanello *et al.*, 2010) และ small deletion / insertion (Maggio *et al.*, 1993, Nopparatana *et al.*, 1998) ซึ่งพบว่าสามารถจะใช้ตรวจหาชนิดมิวเตชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องและแม่นยำสูง ต่อมาได้มีการพัฒนาให้สามารถตรวจโรคธาลัสซีเมียแบบ large gene deletion ซึ่งนอกจากจะช่วยประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ DNA แล้ว ยังสามารถบอกชนิดมิวเตชันสำหรับโรคธาลัสซีเมียชนิดซับซ้อนได้ เช่น complex heterozygote ของแอลฟาพร้อมกับเบต้าธาลัสซีเมียได้อีกด้วย (Lin *et al.*, 2012)

จากการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง พบว่าวิธี PCR ร่วมกับ reverse dot blot hybridization มีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง เท่ากับ 100 % ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธี multiplex gap-PCR ร่วมกับวิธี RDB เหมาะสำหรับนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยโรคฮีโมโกลบินเอช เพื่อให้บริการผู้ป่วยในการตรวจประจำวันได้ และมีความน่าเชื่อถือสูง

## บทที่ 5

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด ฮีโมโกลบินเอช เป็นกลุ่มโรคที่มีอาการทางคลินิกหลากหลาย ตั้งแต่ไม่มีอาการไปจนถึงอาการรุนแรง ซึ่งอาจต้องได้รับเลือดเป็นประจำ ทั้งนี้สาเหตุที่โรคมีการแสดงอาการที่หลากหลาย เป็นเพราะชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ที่แตกต่างกัน โดยปกติแล้วผู้ป่วยที่มีฮีน แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิด non-deletion หรือ non-deletional Hb H disease จะมีอาการที่รุนแรงกว่า มีค่า Hb และ Hct น้อยกว่า และค่า Hb H มากกว่าผู้ป่วยที่มีฮีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิด gene deletion หรือ deletional Hb H disease ซึ่งการทราบชนิดที่แน่นอนของมิวเตชันมีความสำคัญคือทำให้สามารถพยากรณ์ความรุนแรงของโรคได้ ทำให้สามารถให้คำแนะนำสำหรับการควบคุมและป้องกันโรค รวมทั้งเฝ้าระวังผู้ป่วยในระยะที่เม็ดเลือดแดงแตกจากการติดเชื้อหรือเป็นไข้ หรือในสภาวะวิกฤติได้ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจแอลฟาธาลัสซีเมียที่มีความไวและความจำเพาะสูง เพื่อให้สามารถทราบชนิดของมิวเตชัน ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้วิธีเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR ร่วมกับวิธี reverse dot blot hybridization ทำให้สามารถวิเคราะห์มิวเตชันได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ สามารถระบุชนิดของ Hb H disease ได้ ซึ่งจากผลการคำนวณความถี่ของอัลลีลแอลฟาธาลัสซีเมียจากผู้ที่มาใช้บริการที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์จำนวน 141 ราย พบว่า ผู้ป่วย Hb H disease ส่วนใหญ่มีรูปแบบมิวเตชันแบบ deletional Hb H disease ชนิด SEA /- $\alpha^{3.71}$  มีความถี่ร้อยละ 62.78 รองลงมาคือ non-deletional Hb H disease ชนิด SEA deletion/ $\alpha^{CS}$   $\alpha$  ร้อยละ 23.45 และไม่พบอัลลีลของ THAI deletion, 4.2-kb deletion, และ Hb Paksé ซึ่งเคยมีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้านี้

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าวิธี PCR และ reverse dot blot hybridization มีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องสูง ในการตรวจวินิจฉัยโรคฮีโมโกลบิน และสามารถระบุชนิดของโรคได้ทั้งชนิด deletion และ non-deletion และจากการคำนวณความถี่ยีนทำให้สามารถแบ่งเป็น common mutation (มิวเตชันที่พบได้บ่อย) และ rare mutation (มิวเตชันที่พบได้ไม่บ่อย) ทำให้สามารถแยกแอมเบรอนสำหรับใช้ในการตรวจประจำวันได้เป็น 2 ชุด เพื่อเป็นการประหยัดโพรบและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ DNA ซึ่งทำให้ลดค่าใช้จ่ายของผู้ที่มารับการตรวจได้

การศึกษาครั้งต่อไปอาจมีการพัฒนาการทำ PCR ให้สามารถตรวจแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ทั้งชนิด - $\alpha^{3.7}$  และ - $\alpha^{4.2}$  ในครั้งเดียว เพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

## บรรณานุกรม

- Arica V., Arica S.C., 2012. Alpha Thalassemia Disorders. In Özdermir Ö., editors. Contemporary pediatrics. . [monograph on the Internet]. ISBN: 978-953-51-0154-3, InTech, [cited 2013 Apr 12] Available from: <http://www.intechopen.com/books/contemporary-pediatrics/alpha-thalassemia-disorders>.
- Bernini L.F., Hearteveld C.L., 1998.  $\alpha$ - thalassemia. In Bailliére's Clinical Haematology. ISBN: 0-7020-2460-0.
- Boonsa S., Sanchaisuriyab K., Fucharoen G., Wiangnon S., Jetsrisuparb A., Fucharoen S., 2004. The Diverse Molecular Basis and Hematological Features of Hb H and AEBart's Diseases in Northeast Thailand. *Acta Haematol* 111:149–154.
- Bradley T.B., Wohl R.C., Smith G.J., 1975. Elongation of the  $\alpha$ -globin chain in a black family: interaction with HbG Philadelphia. *Clinical Research* 23: 131A
- Chan V., Wan-Yin C.V., Tang M., Lau K., Todd D., Chan T.K., 1997. Molecular defects in Hb H hydrops fetalis. *Brit J Haematol* 96(2): 224-228.
- Chao Y.H., Wu K.H., Wu H.P., Liu S.C., Peng C.T., Lee M.S., 2014. Clinical Features and Molecular Analysis of Hb H Disease in Taiwan. *BioMed Res Int*. InTech, [cited 2013 Apr 6] Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/271070>.
- Charoenkwan P., Taweephon R., Sae-Tung R., Thanarattanakorn P., Sanguansermisri T., 2005. Molecular and clinical features of Hb H disease in northern Thailand. *Hemoglobin* 29 (2): 133-140.
- Chen M., Chan J.K.Y., Nadarajah S., Tan A.S.C., Chan M.L.H., Saw E.E.L., *et al.*, 2015. Single-tube nonaplex microsatellite PCR panel for preimplantation genetic diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. *Prenatal Diag* 35: 1-10.
- Chomean S., Wangmaung N., Sritongkham P., Promptmas C., Mas-oodi S., Tanyong D., *et al.*, 2013. Molecular diagnosis of  $\alpha$ -thalassemias by the colorimetric nanogold. *Analyst* 139: 813-822.
- Chui D.H.K., Fucharoen F., Chan V. 2003. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 101: 791-800.

- Clegg J.B., Weatherall D.J., Milner P.F., 1971. Haemoglobin Constant Spring: a chain termination mutant. *Nature* 234: 337-340.
- Dodé C., Krishnamoorth R., Lamb J., Rochette J., 1992. Rapid analysis of  $\alpha^{3.7}$ -thalassaemia and  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$  triplication by enzymatic amplification analysis. *Brit J Haematol* 82: 105-111.
- Fuchareon S., Viprakasit V., 2009. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. *Am J Hematol* 1: 26-34.
- Fuchareon S., Winichagoon P. 2011. Haemoglobinopathies in Southeast Asia. *Indian J Med Res* (134):498-506.
- Fuchareon S., Winichagoon P., 2002. Thalassemia and Abnormal Hemoglobin. *Int J Hematol* 76(2): 83-9.
- Galanello R., Origa R., 2010. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 5 InTech, Available form: <http://www.ojrd.com/content/5/1/11>.
- Goossens M., Lee K.Y., Liebhaber S.A., Kan Y.W., 1982. Globin structural mutant  $\alpha$  125Leu leads to Pro is a novel cause of  $\alpha$ -thalassaemia. *Nature* 296: 864–865.
- Harteveld C.L., Higgs D.R., 2010.  $\alpha$ -thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 5 InTech, Available form: <http://www.ojrd.com/content/5/1/13>.
- Harteveld C.L., Giordano, P.C., Van Delft P., Batelaan D., Beyer, C., Bernini L.F., 1998. A novel splice donor site mutation of the  $\alpha$ 1-globin gene causing  $\alpha$ -thalassaemia. *Br J Haematol* 102(1): 50
- Higgs D.R. 2009.  $\alpha$ -thalassaemia. In: Steinberg M.H., Forget B.G., Higgs D.R., Weatherall D.J., editors. *Disorders of hemoglobin*. 2nd ed. [monograph on the Internet]. New York:Cambridge University Press. [cited 2013 Apr 4 ] Available from: [www.cambridge.org/9780521875196](http://www.cambridge.org/9780521875196).
- Laosombat V., Viprakasit V., Chotsampanchareon T., et al. 2009. Clinical features and molecular analysis in Thai patients with Hb H disease. *Ann Hematol* 88:1185-1192.
- Leung W.C., Leung K.Y., Lau E.T., Tang M.H.Y., Chan V., 2008. Alpha-thalassaemia. *Semin Fetal Neonatal Med* 13: 215-222.
- Lin M., Zhu L.L., Wang Q., Xie L.X., Lu M., Wang J.L., et al. 2012. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of common alpha and beta thalassaemia in Chinese. *Blood Cells Mol Dis* 48:86-90.

- Liu Y.T., Old J.M., Miles K., Fisher C.A., Weatherall D.J., Clegg J.B., 2000. Rapid detection of  $\alpha$ -thalassemia deletion and  $\alpha$ -globin gene triplication by multiplex polymerase chain reaction. *British journal of haematology.*; 108: 295-299.
- Maggio, A., A. Giambona, S. P. Cai, J. Wall, Y. W. Kan, and F. F. Chehab. "Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily." *Blood* 81, no. 1 (1993): 239-242.
- Nopanitaya T. 2008. Couple at risk of having a child with severe thalassemia. *Journal of health science* 17: SIV1007-SIV1015.
- Nopparatana C. 1998. Molecular diagnosis of thalassemia. *Songklanagarind medical journal* 16:145-59.
- Old J.M., 2003. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood rev* 17: 43-53.
- Paoli M., Liddington R., Tame J., Wikinson A., Dodson G., 1992. Crystal structure of T state Haemoglobin with oxygen bound at four Haems. *J Mol Bio* 256(4): 775-792.
- Pornprasert S., Phusua A., Suanta S., Saetung R., Sanguansermisri T., 2008. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asia type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol* 80 (6): 510-514.
- Sanguansermisri T., Matragoon S., Changloah L., Flatz G., 1979. Hemoglobin suan-dok ( $\alpha_2$ 109(g16)LEU-ARG $\beta_2$ ). An unstable variant associated with  $\alpha$ -thalassemia. *Hemoglobin* 3(2-3): 161-174
- Thein and Wood *et al.*, 2009. Beta-thalassemia. In: Steinberg M.H., Forget B.G., Higgs D.R., Weatherall D.J., editors. *Disorders of hemoglobin*. 2nd ed. [monograph on the Internet]. New York:Cambridge University Press. [cited 2013 Apr 4 ] Available from: [www.cambridge.org/9780521875196](http://www.cambridge.org/9780521875196).
- Wanapirak C., Munithorn W., Sanguansermisri T., Dhananjayanonda P., Tongsong T., 2004. Prevalence of Thalassemia in Pregnant Women at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. *Med Assoc Thai* 87 (21): 1415-1418.
- Wasi P., 2013. Thalassemia. The national institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. [cited 2013 Apr 4 ] Available from: [http://webdb.dmhc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_1\\_001c.asp?info=id403](http://webdb.dmhc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info=id403)



Waye J.S., Eng B., Patterson M., et al. Novel mutation of the  $\alpha_2$ -globin gene initiation codon (ATG->A-G) in a Vietnamese girl with HbH disease. *Blood*. 1996;88:28b (abstract).

Wee Y.C., Tan K.L., Chua K.H., George E., Tan J.A.M.A. 2009. Molecular characterisation of Haemoglobin Constant Spring and Haemoglobin Quong Sze with a Combine-Amplification Refractory Mutation System. *Malays J Med Sci* 16(3): 21-28.

Winichagoon P., Fuchareon S., 1998. editors. *Thalassemia: Gene analysis by polymerase chain reaction technique (PCR)*. Bangkok: Thalassmia research center: 15-21.

**ภาคผนวก**

สารละลายสำหรับการล้างเซลล์**50X TAE**

สารละลาย 1,000 ml ประกอบด้วย

- Tris base (MW 121.24)            242     g
- glycolic acetic acid                57.1     ml
- 0.5 M EDTA, pH 8                100     ml
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งด้วย autoclave

สารละลายสำหรับการตรึง ASO – probe

Amino – modified ASO probes เตรียมโดย couple 5' terminal base ด้วย amino group สำหรับตรวจหาไวรัส เช่น ให้มีความเข้มข้นตามต้องการ โดยเจือจางด้วย 0.5 M sodium bicarbonate buffer

**0.5 M sodium bicarbonate buffer**

สารละลาย 100 ml ประกอบด้วย

- NaHCO<sub>3</sub> (MW 84.01) 4.2 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (MW 106) 5.28 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml

วัด pH ของ 0.5 M NaHCO<sub>3</sub> และปรับให้ได้ pH 8.4 ด้วย 0.5 M ด้วย Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**16 % EDC [1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl]**

เตรียมโดย ชั่ง EDC 0.8 g ละลายในน้ำกลั่น 5 ml และเตรียมเมื่อต้องการใช้

สารละลายสำหรับ hybridization reaction**20X SSPE**

สารละลาย 1,000 ml ประกอบด้วย

- 3.6 M NaCl (MW 58.44)                            210     g
- 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O (MW 156.01)            31.2     g
- 20 mM EDTA disodium (MW 327.24)            7.4     g

ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ด้วย 10 M NaOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml และนำไป autoclave

### 10 % SDS

สารละลาย 200 ml ประกอบด้วย

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

### Hybridization buffer

สารละลาย 200 ml ประกอบด้วย

- 20X SSPE 30 ml
- 10% SDS 10 ml
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 200 ml

### Washing buffer

สารละลาย 1,000 ml ประกอบด้วย

- 20X SSPE 100 ml
- 10% SDS 10 ml
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

### Buffer I

สารละลาย 1,000 ml ประกอบด้วย

- 1M Tris pH 7.5 100 ml
- 4M NaCl (MW 58.44) 37.5 ml
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

### Blocking reagent

สารละลาย 200 ml ประกอบด้วย

- Blocking powder 2 g
- Buffer I 200 ml
- บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C จนกว่า Blocking powder จะละลายหมด

### 0.3% Tween 20

สารละลาย 200 ml ประกอบด้วย

- Buffer I 200 ml

- Tween 20                      600      $\mu$ l

**Detection buffer**

สารละลาย 200 ml ประกอบด้วย

- 1 M Tris pH 9.5              20     ml

- 4 M NaCl                      5     ml

- 1 M MgCl<sub>2</sub>                    1     ml

- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 ml

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นางสาวเกศรา นิตยบุรณ์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5510320022	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

## ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2556

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

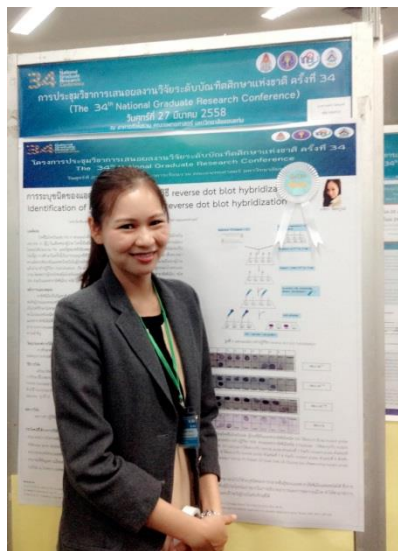
นางสาวเกศรา นิตยบุรณ์. "การระบุชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ด้วยวิธี Reverse Dot Blot

Hybridization", ใน โครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 34 . 27/03/2558. อาคารเรียนรวม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น : บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น.

## ผลงานจากการเผยแพร่ผลงาน



รูปการนำเสนอผลงานวิชาการและรับเกียรติบัตรจากการได้รับรางวัล



ภาพการนำเสนอผลงานและรับรางวัล โครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา  
แห่งชาติ ครั้งที่ 34 เมื่อวันที่ 27 มีนาคม 2558 ณ อาคารเรียนรวม คณะแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น



ภาพการรับรางวัลจาก รศ.นพ. สุธรรม ปิ่นเจริญ คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์