รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

รหัสโครงการ MED40029

เรื่อง

การตรวจดีเอ็นเอของบีตาธาลัสซีเมียโดยวิธีพีซีอาร์และดอทบลอท ไฮบริไดเซชั่นกับโอลิโกโพรบที่ยึดติดบนไนลอนเมมเบรน

DNA diagnosis of beta thalassemia with PCR and immobilized oligonucleotide probe on nylon membrane (reverse dot blot hybridization)

คณะผู้วิจัย

นายจำนงค์ นพรัตน์
นางสาววรรณรัตน์ แซ่ซั้น
นายศตรณ กาญจนโอภาส

หน่วยธาลัสซีเมีย ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

520
เลขหมู่ RC261.7.T5 A63 254 ฉ.1
Bib Key 222992

บทคัดย่อ

ภาษาไทย

บีตาธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบบ่อยและเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โรคบีตาธาลัสซีเมียเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบิน ซึ่งลักษณะการกลายพันธุ์มีหลายชนิด ที่ตรวจพบแล้วมีเกือบ 200 ชนิด วิธีที่นิยมใช้ตรวจการกลายพันธุ์ธาลัสซีเมียชนิดนี้คือ วิธี ASO-probe hybridization ของท่อนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ วิธีที่ได้พัฒนาจากวิธีนี้คือ วิธี reverse dot blot hybridization ซึ่งสามารถทำได้โดยนำเอา ASO probes ไปยึดติดกับแผ่นไนลอนโดย covalent bond ระหว่าง amino group ที่ติดอยู่กับ probe และ carboxyl group บน nylon membrane เสร็จแล้วนำไป hybridize กับ ท่อนพีซีอาร์ของดีเอ็นเอจากผู้ป่วย ซึ่งในการทำพีซีอาร์จะใช้ PCR primers ที่มี biotin ติดอยู่ด้วย โดยวิธีการดังกล่าวทำให้สามารถตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ได้รวดเร็ว และสามารถตรวจได้หลายชนิดพร้อมๆกัน ในการทดลองนี้สามารถตรวจได้ 17 มิวเตชั่นในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว นอกจากนี้วิธีนี้มีข้อดีคือ ไม่ต้องใช้สารกำมันตรังสี ทำให้ประหยัดและมีขั้นตอนการทำที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน การพัฒนาวิธีนี้ที่ยากที่สุดคือการออกแบบ probe ให้มีสามารถทำปฏิกิริยาได้ในภาวะเดียวกัน ซึ่งสามารถทำได้โดยการออกแบบให้มีจำนวนและชนิด nucleotide ใกล้เคียงกัน ในการทดลองนี้ ได้นำเอาวิธี reverse dot blot hybridization ใช้ตรวจทารกในครรภ์ที่เสี่ยงต่อบีตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจำนวน 16 ราย

ภาษาอังกฤษ

β-Thalassemia is the most common genetic disease and a public health problem of Thailand. The disease is caused by various mutations of β-globin gene which nearly 200 mutations have been detected. A widely used technique for identifying these mutations is allele-specific oligonucleotide (ASO) hybridization of polymerase chain reaction (PCR) products. An adaptation of this method is reverse dot blot hybridization. The method involves covalently binding amino-modified oligonucleotide probes to the membrane-bound carboxyl group and hybridizing with biotin-labeled PCR fragments of β-globin gene. Hybridization is detected non-radioactively by enzyme-catalyzed color reaction. This method provide a rapid and simple procedure for screening all point mutations of β-thalassemia. This technique provides a rapid and simultaneous analysis of an entire series of sequence in a single hybridization reaction Its advantages are the ability to identify many different point mutations (17 mutations) in a single hybridization, and the capability to test a large number of PCR-amplified samples simultaneously in a working day. In

addition, it is non-radioactive, inexpensive and not requires specific technical skills. The difficulty for this analytical technique is the requirement of identical hybridization and washing conditions for all ASO probes on the nylon membrane, these can be achieved by adjusting the length of each ASO probe and its base composition. In this study we used the reverse dot blot hybridization for prenatal diagnosis of 16 couple at risk of having severe β-thalassemia.

คำหลัก (key words) : beta-thalassemia, Southern Thailand, reverse dot blot, hybridization, beta-globin, PCR

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ชนิดการกลายพันธุ์และความถี่ของยีนบีตาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง	2
ตารางที่ 2	แสดงผลการตรวจทางโลหิตวิทยาและผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของตัวอย่างบีตาธาลัสซีเมีย	7
ตารางที่ 3	คุณสมบัติ oligonucleotide probes ที่ใช้ในการทำ reverse dot blot hybridization	10
ตารางที่ 4	ผลการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ในคู่สามีภรรยาที่มีโอกาสมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จำนาน 16 คู่	14

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1. ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบในประเทศไทย 1

รูปที่ 2. ขั้นตอนการทำโอลิโกโพรบไฮบริไดเซชั่นแบบ "reverse" โดยผนึกโอลิโกโพรบบนแผ่นไนลอนแล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอที่ได้จากพีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน แล้วอ่านผลด้วยอะวิดินและเอนไซม์กับสับเตรท ผลบวกจะให้สีน้ำเงินม่วง 5

รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของ primers China 1, China 2, China 3 และ China 4 บนบีตา-โกลบินยีน และแสดงขนาดของ PCR ที่เกิดจาก primers ทั้ง 2 ชุด คือ ขนาด 602 เบส จาก primers China 1 และ China 2 และ 423 เบส จาก primers China 3 และ China 4 8

รูปที่ 4 แสดงผลพีซีอาร์โดยใช้ primers China 1 กับ China 2 และ primers China 3 กับ China 4 10

รูปที่ 5 แสดงภาพถ่ายจากผล reverse dot blot strips ในแต่ละ strip มี probes ที่จำเพาะสำหรับ mutations ต่างๆ 17 ชนิด 12

รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของ primers China 1, China 2, China 3 และ X บนบีตาโกลบินยีน และแสดงขนาดของ PCR ที่เกิดจาก primers ทั้ง 2 ชุด คือ ขนาด 602 เบส จาก primers China 1 และ China 2 และ 720 เบส จาก primers China 3 และ X 13

รูปที่ 7 แสดงผลพีซีอาร์โดยใช้ primers China 1 กับ China 2 และ primers China 3 กับ primer X ในปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน เปรียบเทียบกับผลพีซีอาร์ที่แยกชุด primer 13

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. บทนำ	1
2. วัตถุประสงค์	4
3. วิธีดำเนินการวิจัย	
1. ตัวอย่างที่ใช้ตรวจ	5
2. วิธีทำ reverse dot blot hybridization	5
3. เปรียบเทียบความไวและความจำเพาะกับเทคนิคการตรวจหามิวเตชั่นมาตรฐาน	5
4. ผลการวิจัย	
1. เก็บ DNA จากผู้ป่วยและพาหะเบตา-ธาลัสซีเมียที่มาตรวจที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์	7
2. การพัฒนาวิธีการทำ reverse dot blot hybridization	8
3. การพัฒนาวิธีทำพีซีอาร์โดยใช้ primer ทั้ง 2 ชุดในปฏิกิริยาเดียวกันเพื่อลดต้นทุน	12
4. ผลการทำ Hybridization ให้ผลเช่นเดียวกับการใช้ primer แต่ละชุดแยกทำปฏิกิริยา	13
5. ใช้เทคนิค reverse dot blot hybridization ตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียในพาหะและทารกในครรภ์	13
5. ข้อวิจารณ์และข้อเสนอแนะ	15

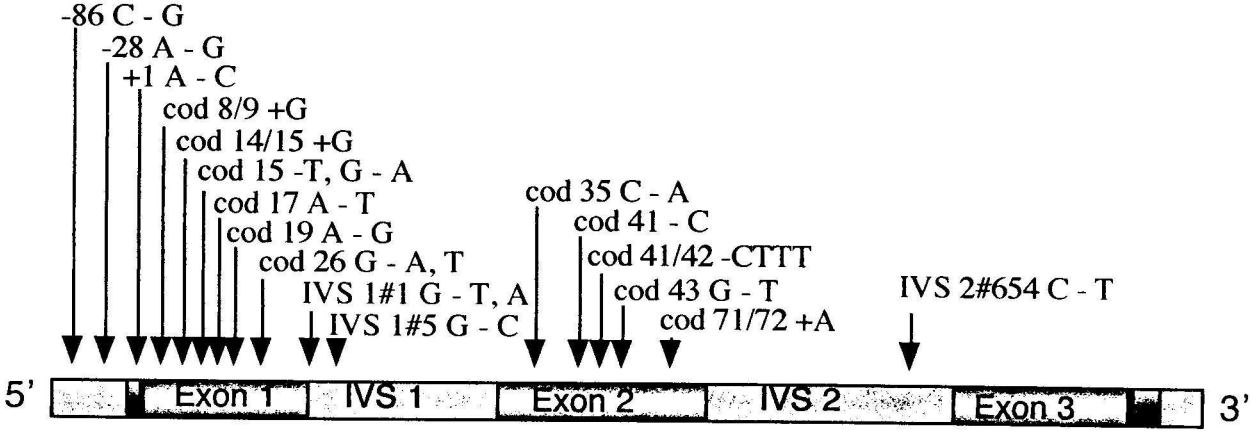
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ

ASO	Allele-specific oligonucleotide
bp	Basepair
CD, cod	Codon
DNA	Deoxyribonucleic acid
Hb	Hemoglobin
I, IVS	Intervening sequence
PCR	Polymerasechainreaction
RDB	Reverse dot blot hybridization
Tm	Melting temperature

บทนำ

โรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อย และเป็นปัญหาที่สำคัญ ในประเทศไทยโรคหนึ่ง โดยเฉลี่ยประชากรไทยประมาณ 3-9% เป็นพาหะของเบตาธาลัสซีเมีย (1) เบตาธาลัสซีเมีย เกิดจากการที่ร่างกายสร้างสายเบตาโกลบินของฮีโมโกลบินในปริมาณที่น้อยกว่าปรกติ หรือไม่สร้างเลย ทำให้สายโกลบินที่ไม่มีความผิดปรกติ (เช่น สายอัลฟาโกลบิน) มีปริมาณเกินดุลสายโกลบินที่เกินมาอยู่ภายในเม็ดเลือดแดงนี้ทำให้เม็ดเลือดแดงมีความผิดปรกติและถูกทำลายได้ง่าย เกิดเป็น hemolytic anemia ทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีด เหลือง ตับม้ามโต เจริญเติบโตช้า มีการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มมากกว่าปรกติ เพื่อทดแทนเม็ดเลือดแดงที่แตกทำลายไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระดูก ทำให้กระดูกใบหน้าเปลี่ยนไปมีลักษณะที่เรียกว่า "ใบหน้าธาลัสซีเมีย" และมีความผิดปรกติอื่นๆ ของร่างกายอีกหลายประการ (2)

ปัจจุบันพบว่าเบตาธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากการผ่าเหล่า (mutation) ของโมเลกุล DNA ของยีนเบตาโกลบิน (3) ในประเทศไทย พบชนิดของการผ่าเหล่าของเบตาธาลัสซีเมียแล้วมากกว่า 20 ชนิด (ตารางที่ 1) ส่วนใหญ่เป็น point mutation คือมีการเปลี่ยนแปลงไปของชนิดของเบส หรือเบสจำนวนน้อยๆ ขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาบนสาย DNA (4-8) เบตาธาลัสซีเมียส่วนน้อยเกิดจากยีนเบตาโกลบิน บางส่วนหรือทั้งยีนแหว่งหายไปจากโครโมโซม (8) ตำแหน่งของ point mutation ของบีตาโกลบินยีนแสดงในไดอะแกรมที่ 1



รูปที่ 1 ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบในประเทศไทย

การตรวจหาชนิดของการผ่าเหล่าของเบตาธาลัสซีเมีย มีประโยชน์ในการช่วยบอกความรุนแรงของโรค (prognosis) ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (genetic counseling) แก่ผู้ที่เป็นธาลัสซีเมีย และช่วยในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ (prenatal diagnosis) และการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation)

ตารางที่ 1 ชนิดการกลายพันธุ์และความถี่ของจีนบีตาธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง (ND = not determined)

ชนิดการกลายพันธุ์	ความถี่ (ร้อยละ)							
	ไทย				มาเลเซีย	พม่า	อินเดีย	จีน
	ใต้	กลาง	เหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ				
Codon 41/42 (TTCTTT->TT)	30.1	41.6	39.8	37.7	12.2	21.2	11.8	46.7
IVS 1#5 (G->C)	18.8	4.3	2.8	0	48.8	27.2	22.5	1.9
Codon 19 (AAC-AGC)	15.2	2.9	ND	0	14.6	0	0	0
Codon 17 (AAG->TAG)	11.3	16.5	39.8	29.5	2.4	7.1	0	17.6
IVS1#1 (G->T)	6.0	1.3	ND	1.6	7.3	34.3	13.7	0.5
-28 (A->G)	5.7	9.3	3.5	1.6	0	4.0	0	11.1
3.5 kb deletion	4.3	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IVS2#654 (C->T)	2.1	8.0	1.4	9.8	7.3	2.0	0	13.9
Codon 41 (-C)	1.4	0.8	ND	0	0	0	0	0
Codon 8/9 (AGTCT->AGGTCT)	0.4	0	0	0	0	0	19.6	0
105 bp deletion	0.4	0	0	0	0	0	0	0
codon 15 (TGG->TAG)	0.4	0	0	0	0	0	4.9	0
CAP site (A->C)	0.4	0	0	0	0	0	2.0	0
IVS1#1 (G->A)	0.4	0	0	0	0	0	0	0
-88 (C-T)	0	0	0	0	0	0	2.0	0
-86 (C-G)	0	0.5	0	0	0	0	0	0
Cod 16 (-C)	0	0	0	0	0	0	1.0	0
Cod 35 (C->A)	0	2.7	0	0	0	0	0	0
Cod 35 (-C)	0	0	0	0	4.8	0	0	0
Cod 71/72 (+A)	0	2.1	0	13.1	0	0	0	7.4
Cod 26 (G-T)	0	ND	0	1.6	0	0	0	0
619 bp deletion	0	1.1	0	0	0	0	20.5	0
Cod 43 (G-T)	0	0.8	0	0	0	0	0	0
Cod 15 (-T)	0	0.3	0	0	0	0	0	0
Cod 14/15(+G)	0	0.3	0	0	0	0	0	0
uncharacterized	3.1	5.1	13.3	4.9	2.4	4.1	2.0	0.5
จำนวนอัลลีลที่ศึกษา	282	375	113	61	41	99	102	216

Central Library
Prince of Songkla University

การตรวจหาชนิดของการผ่าเหล่าของเบตาธาลัสซีเมีย ต้องอาศัยเทคนิคทาง molecular biology ในอดีตจะต้องทำ hybridization ของ genomic DNA กับตัวตรวจสอบชนิดของการผ่าเหล่าที่จำเพาะ [allele specific oligonucleotide (ASO) probes] ซึ่งมีวิธีการยุ่งยากเพราะจะต้องย่อย DNA ด้วย restriction enzyme และ run electrophoresis แล้วจึงทำ hybridization (5,9) วิธีดังกล่าวนี้จะต้องใช้ DNA ของผู้ป่วยจำนวนมาก ใช้เวลานานและจะต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ^{32}p ต่อมาปี ค.ศ.1985 Saiki และคณะ ค้นพบเทคนิคการเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลอง โดยอาศัยปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ polymerase enzyme (10) ทำให้สามารถตรวจหาชนิดของการผ่าเหล่าของยีนเบตาธาลัสซีเมียได้โดยการทำ dot blot hybridization กับ ASO probes ชนิดต่างๆ (11,12) หรือทำ allele specific PCR (13) หรือทำ PCR แล้วย่อยด้วย restriction emzymers (14) เป็นต้น อย่างไรก็ดี วิธีการดังกล่าวข้างต้น เป็นการตรวจหาชนิดของการผ่าเหล่าคราวละชนิดเพราะจะต้องใช้ probe ที่เฉพาะเจาะจงหรือใช้ allele specific - PCR primer คราวละ 1 คู่ ทำให้เสียเวลา และเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นในการสุ่มหาชนิดของเบตาธาลัสซีเมีย เทคนิค reverse dot blot analysis จะช่วยให้ตรวจหาชนิดของการผ่าเหล่าของยีนธาลัสซีเมียได้ครั้งละหลายชนิด (15) หลักการของเทคนิคนี้ คือ การสร้าง ASO probes หลายๆ ชนิดที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) นำมายึดติดบนแผ่นไนลอน เมมเบรนที่เป็นประจุลบ แล้วนำ DNA ของผู้ป่วยที่ได้ทำ PCR โดยให้นิวคลิโอทัยด์บนสาย DNA ติดสลากอยู่กับ biotin มา hybridize กับ ASO probes บนแผ่นเมมเบรนดังกล่าว แล้วจึงตรวจสอบปฏิกริยา hybridization ระหว่าง ASO probe กับ DNA ของผู้ป่วยโดยการทำ color detection วิธีการดังกล่าวจะทำให้สามารถทราบชนิดของการผ่าเหล่าของยีนได้โดยการทำ hybridization เพียงครั้งเดียว เพราะเป็นการนำ DNA ของผู้ป่วยมา hybridize กับ ASO probes หลายๆ ชนิดที่ยึดติดอยู่บนแผ่นเมมเบรนแผ่นเดียวกัน วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว สำหรับตรวจหาชนิดของการผ่าเหล่าของยีนธาลัสซีเมีย และเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาความผิดปรกติของยีนในทารกก่อนคลอด ในคู่สมรสที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของการกลายพันธุ์ของยีนเบตาธาลัสซีเมียในคนไทย ซึ่งมีมากกว่า 20 ชนิด ให้สามารถวินิจฉัยได้อย่างแม่นยำ โดยการตรวจเพียงครั้งเดียว การวินิจฉัยนี้จะมีประโยชน์ในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม และการตรวจวินิจฉัยทารกก่อนคลอดในคู่สมรสที่มีความเสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรง

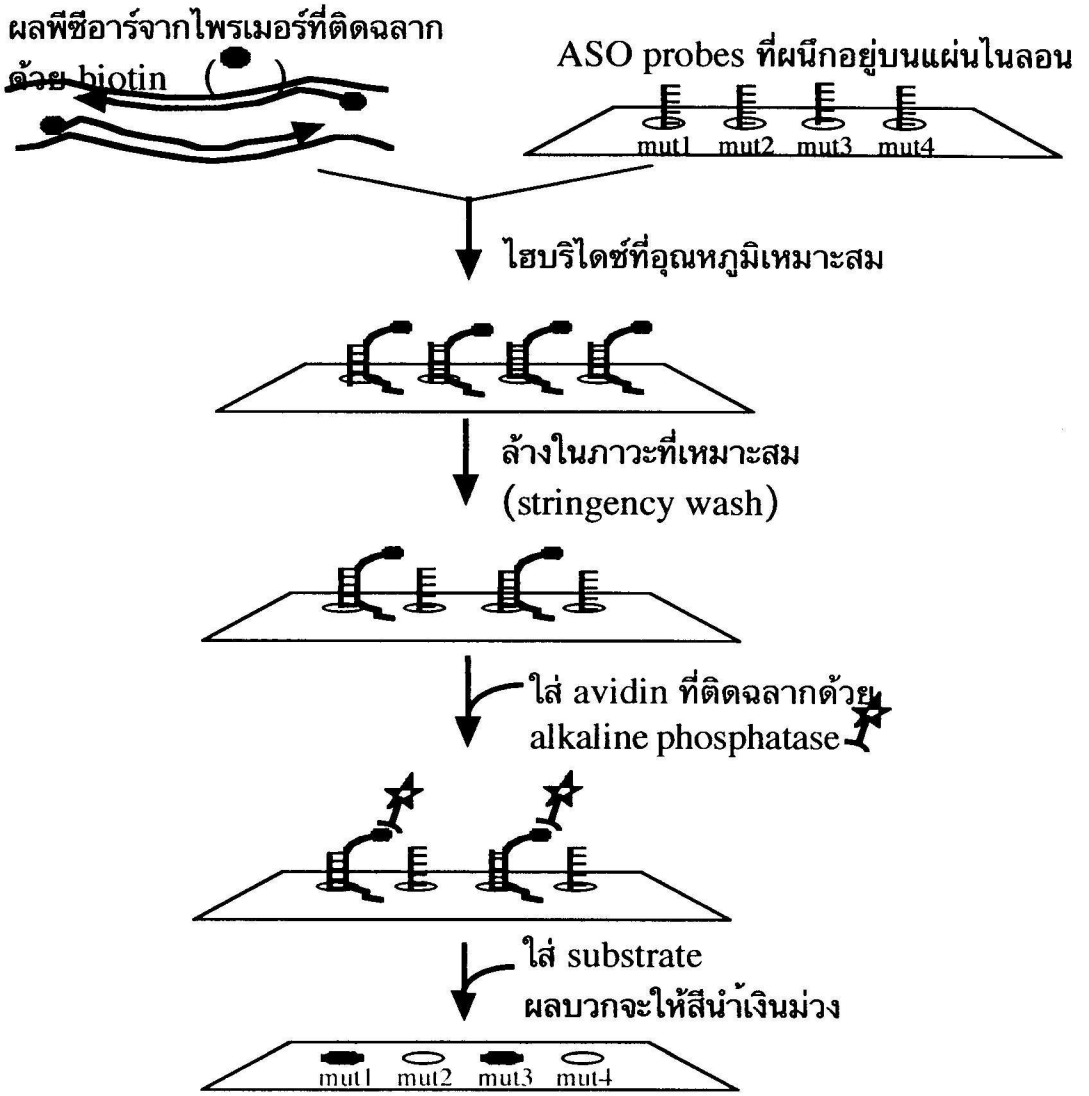
วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ตรวจ

1.1 เก็บ DNA จากผู้ป่วยและพาหะเบตา-ธาลัสซีเมียที่มาตรวจที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และทราบชนิดของ mutation โดยการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานเดิม คือ dot blot hybridization ประมาณ 200 โครโมโซม

1.2 ตัวอย่าง DNA ที่ส่งมาตรวจวินิจฉัยทารกก่อนคลอดในคู่สมรสที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรค และ DNA ของพ่อแม่ทารกดังกล่าว

2. วิธีทำ Reverse Dot Blot Hybridization (ขั้นตอนในการทำ สรุปในไดอะแกรมรูปที่ 2)



รูปที่ 2. ขั้นตอนการทำโอลิโกโพรบไฮบริไดเซชั่นแบบ "reverse" โดยผนึกโอลิโกโพรบบนแผ่นไนลอน แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอที่ได้จากพีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน แล้วอ่านผลด้วยอะวิดินและเอนไซม์กับสับเตรท ผลบวกจะให้สีน้ำเงินม่วง

2.1 เพิ่มปริมาณ DNA โดยทำ PCR เฉพาะส่วนของบีตาโกลบินยีน โดยใช้ primers ที่ติดฉลากด้วย biotin ที่ปลายข้าง 5'

2.2 Activate carboxyl group บนเมมเบรนด้วย 16% 1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCL (EDC, Sigma E 7750) นาน 15 นาที เพื่อให้ NH_2 ของ ASO-probe สามารถยึดติดกับประจุลบของ Biodyne C nylon membrane แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และซับให้แห้งสนิทด้วยกระดาษกรอง 3M

2.3 เตรียม ASO-probe ที่มี NH_2 ที่ปลาย 5' โดยสั่งสังเคราะห์จากเครื่อง DNA synthesizer มีความยาว 17-19 เบส และ Tm ประมาณ 48-52°C

2.4 นำ ASO-probe มายึดติดกับ nylon membrane โดยละลาย oligonucleotide ใน 0.5 M sodium bicarbonate buffer, pH 8.4 ให้มีความเข้มข้นประมาณ 2-5 pmol/μl โดยใช้ประมาณ 2 μl หยดลงบนแผ่นเมมเบรนที่กระตุ้นแล้ว ทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 15 นาที แล้วแช่ใน 0.1 M NaOH นาน 5-10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อ neutralize เมมเบรน ล้างน้ำ 2-3 ครั้ง และทิ้งให้แห้ง สามารถเก็บเมมเบรนที่มี oligonucleotide จับอยู่นี้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง

2.5 การทำ hybridization ของ PCR-DNA และ ASO-probe

2.5.1 prehybridization โดยแช่แผ่นเมมเบรนที่มี ASO-probes ยึดติดอยู่ใน 2xSSC/0.1% SDS 2 ml ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 30 นาที

2.5.2 denature PCR-DNA (45 μl) โดยการต้มนาน 5-10 นาที เพื่อแยกให้เป็น single strand แล้วใส่ทั้งหมดลงในถุงที่มี prehybridized membrane

2.5.3 hybridization ที่อุณหภูมิ 45-60°C นาน 45 นาที

2.5.4 ล้างเมมเบรนด้วย 2xSSC/0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 10 นาที

2.6. Enzymatic Detection โดยใช้ enzymatic reaction โดยแช่ hybridized strip ในภาชนะที่มี 2xSSC/0.1% SDS/1:1000 streptavidine alkaline phosphatase เขย่านาน 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 2xSSC/0.1% SDS 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที และล้างใน Genius buffer (100 mM tris pH 9.5/5 mM $MgCl_2$/100 mM NaCl) นาน 5 นาที เติม substrate NBT/BCIP ละลายใน Genius buffer 10 ml ทิ้งไว้ที่มืดในอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ผลบวกจะเกิดสีม่วงเข้ม

3. เปรียบเทียบความไวและความจำเพาะกับเทคนิคการตรวจหามิวเตชั่นมาตรฐาน คือวิธี direct dot blot hybridization ที่ใช้ DIG-enzymatic detection system ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการธาลัสซีเมีย

ผลการวิจัย

1. เก็บ DNA จากผู้ป่วยและพาหะเบตา-ธาลัสซีเมียที่มาตรวจที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และทราบชนิดของ mutation โดยการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานเดิม คือ dot blot hybridization ประมาณ 200 โครโมโซม ผลการตรวจแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจทางโลหิตวิทยาและผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของตัวอย่างบีตาธาลัสซีเมีย

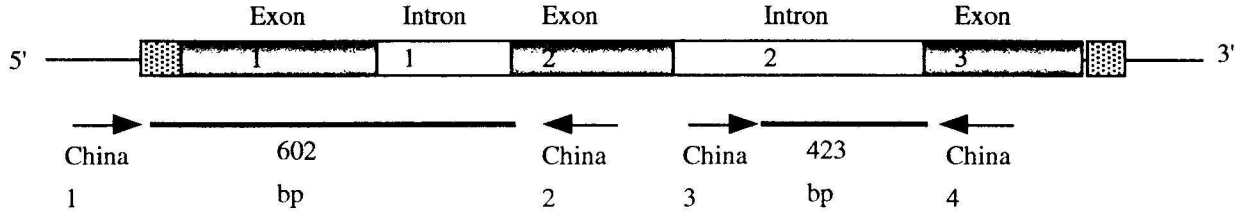
Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	%A2	%F	OF	DCIP	Mutation	Diagnosis
1985	F	26	9.4	30	65	20.6	AA2	5.5		27	0	I 1#5 / N	Beta trait
1987	F	17	10.3	33	58	18.1	AA2	5.4		49	0	cod 17 / N	Beta trait
2033	F	32	9.2	26	47	16.6	AA2	7.7		75	0	cod 17 / N	Beta trait
2037	F	21	11.8	38	65	20.3	AA2	5.1		72	0	cod 17 / N	Beta trait
2118	F	26	9.2	28	68	22.6	AFA2	3.9		31	0	cod 19 / N	Beta trait
2129	F	36	10	33	67	20.7	AA2	4.8		34	0	4 bp / N	Beta trait
2168	M	33	7.6	23	68	22.9	AA2	6.2		40	0	3.5 kb / N	Beta trait
2201	M	26	12.1	38	77	24.6	AA2	5.7		60	0	-28 / N	Beta trait
2203	F	21	11.2	35	66	21	AA2	6.1		62	0	-28 / N	Beta trait
2206	F	9	11.4	36	67	21.2	AA2	5.7		60	0	-28 / N	Beta trait
2212	F	27	9.1	27	65	21.9	AA2	5.2		18	0	4bp / N	Beta trait
2233	F	24	8.7	28	55	17.1	AA2	5.7		46	0	cod 17 / N	Beta trait
2284	M	26	10.8	35	66	20.1	AA2	5.5		72	0	I 2#654 / N	Beta trait
2315	M	35	12.9	40	71	22.6	AA2	6.1		50	1	4 bp / N	Beta trait
2321	F	19	9.2	29	63	20	AA2	5.8		50	0	cod 19 / N	Beta trait
2332	M	59	4.5	18	87	26.6	AA2	4.7		80	0	cod 19 / N	Beta trait
2334	F	30	10.7	32	69	22.9	AA2	4.3		63	0	I 1#5 / N	Beta trait
2359	M	30	11.8	38	62	19.2	AA2	6		59	0	4 bp / N	Beta trait
2376	F	25	11.5	37	67	20.8	AA2	4.8		62	0	I 1#5 / N	Beta trait
2466	M	33	12.5	39	57	18.2	AA2	5.2		62	0	I 1#5 / N	Beta trait
2477	F	31	11.9	35	69	23.2	AA2	5.3		45	0	I 1#1 / N	Beta trait
2481	F	35	10.9	34	60	19.1	AA2	4.2		30	0	4 bp / N	Beta trait
2500	M	28	12.6	40	66	21.1	AA2	6.2		55	0	3.5 kb / N	Beta trait
2508	F	28	9.2	28	60	19.3	AA2	4.5		55	0	I 1#5 / N	Beta trait
2509	M	30	11.4	35	63	19.9	AA2	5.7		55	0	4 bp / N	Beta trait
2510	F	1	7.9	21	82	30.7	AFA2	5.6		84	0	3.5 kb / N	Beta trait
2514	F	30	10.7	32	64	21.6	AA2	5.6		76	0	-28 / N	Beta trait
2529	F	65	5.8	18	59	19.4	AA2	3.7		65	0	I 1#5 / N	Beta trait
2535	F	29	9	29	72	22.4	AA2	5.1		75	0	3.5 kb / N	Beta trait
2555	M	91	6.3	20	72	21.1	AA2	4.6		70	0	4 bp / N	Beta trait
2560	M	34	9.6	33	73	21.3	AA2	5.3		75	0	cod 19 / N	Beta trait
2577	F	19	9.2	31	66	19.5	AA2	5		55	0	cod 19 / N	Beta trait
2593	F	28	11	34	69	22.4	AA2	3.8		69	0	cod 19 / N	Beta trait
2595	F	32	10.6	33	63	19.9	AA2	5.4		46	0	4 bp / N	Beta trait
2596	M	32	13.4	41	60	19.9	AA2	4.9		55	0	4 bp / N	Beta trait
2600	F	31	7.2	22	75	24.7	AA2	4.3		65	0	4 bp / N	Beta trait

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Code	Sex	Age	Hb	HCT	MCV	MCH	Typing	%A2	%F	OF	DCIP	Mutation	Diagnosis
1980	M	7	6.5	18	56	19.8	FE	41.5		54	1	3.5 kb / HbE	Beta/HbE
1993	M	23	9.1	29	71	22.4	AFE	18		45	1	-28 / HbE	Beta/HbE
2041	M	31	9	28	69	21.7	AFE	50.7		45	1	-28 / HbE	Beta/HbE
2135	F	4	7.8	24	60	19.6	FE	46.6		22	1	I 2#654 / HbE	Beta/HbE
2137	F	29	8.3	26	72	23.3	FE	46.4		34	2	4bp / HbE	Beta/HbE
2138	F	14	7.7	23	61	20.2	FE	43.1		42	1	I 2#654 / HbE	Beta/HbE
2171	F	11	6.2	21	59	20.9	FE	34.9		20	1	I 1#1 / HbE	Beta/HbE
2172	M	6	3.6	13	60	17	FE	61.1		18	2	4 bp / HbE	Beta/HbE
2317	M	22	10.1	28	79	28.4	AE	34.2		85	1	HbE/N	HbE trait
2587	F	30	12.3	39	78	24.6	AE	32.3		97	1	HbE/N	HbE trait
2592	F	26	12.6	38	82	27.2	AE	30.5		79	1	HbE/N	HbE trait
2612	M	35	14	43	75	24.3	AE	30.4		83	1	HbE/N	HbE trait
2617	M	24	13.7	42	80	26.1	AE	31.6		80	1	HbE/N	HbE trait
2623	M	25	14.1	42	75	25	AE	31.9		100	1	HbE/N	HbE trait
2043	F	29	10.6	32	61	20.5	EE	100		45	2	HbE/HbE	Homo E
2134	M	12	9.2	28	57	18.4	EE	100		37	3	HbE/HbE	Homo E
2338	F	35	9.8	30	67	21.6	EE	100		22	3	HbE/HbE	Homo E
2341	F	18	11	34	64	20.6	EE	100		50	3	HbE/HbE	Homo E
2421	F	42	9.6	28	58	19.5	EE	100		22	2	HbE/HbE	Homo E
2423	M	84	9	27	67	22.6	EE	100		25	3	HbE/HbE	Homo E
2432	F	37	9	27	61	20.3	EE	100		50	3	HbE/HbE	Homo E
2486	F	7	8.2	24	51	17.2	EE	100		25	3	HbE/HbE	Homo E
2589	F	27	8.2	27	66		EE	100		22	3	HbE/HbE	Homo E
2740	F	12			66		AFA2	2.3	11.54	23	0	4 bp/cod 19	Major
7999	F	11	13.5	41	67		AFA2	1.7	13.4	48	0	cod19/I 1#5	Major

2. การพัฒนาวิธีการทำ reverse dot blot hybridization

2.1 การทำพีซีอาร์โดยใช้ primers ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน โดยใช้ primers 2 ชุด ตำแหน่งและลำดับเบสของ primers แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของ primers China 1, China 2, China 3 และ China 4 บนบีตาโกลบินยีน และแสดงขนาดของ PCR ที่เกิดจาก primers ทั้ง 2 ชุด คือ ขนาด 602 เบส จาก primers China 1 และ China 2 และ 423 เบส จาก primers China 3 และ China 4

ลำดับเบสของ primers ทั้ง 4 คือ

China 1 : 5'-biotin-GTA CGG CTG TCA TCA CTT AGA CCT CA-3'

China 2 : 5'-TGC AGC TTG TCA CAG TGC AGC TCA CT-3'

China 3 : 5'-biotin-GTG TAC ACA TAT TGA CCA AA-3'

China 4 : 5'-AGC ACA CA "G ACC AGC ACG TT-3'

2.2 ปฏิกิริยาพีซีอาร์

PCR mixture ปริมาตรรวม 50 µl

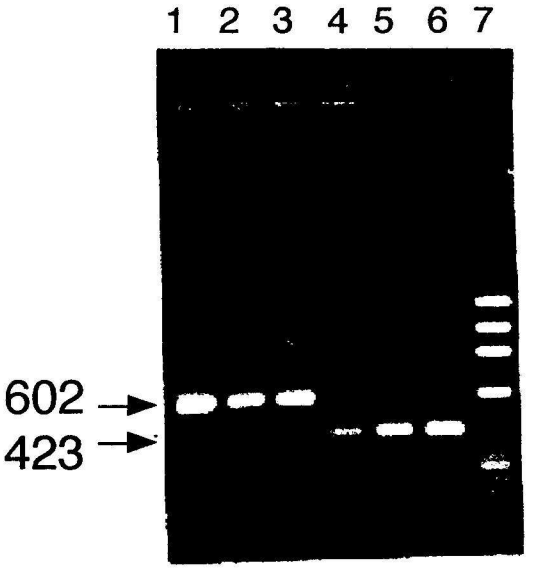
DNA	200	ng
10xbuffer	5	µl
25 mM MgCl2	3	µl
Primer 1 (30 pmol/µl)	0.5	µl
Primer 2 (30 pmol/µl)	0.5	µl
1.25 mM dNTPs	8	µl
5 U/µl Taq Polymersase	0.25	µl

เติมน้ำให้มีปริมาตร 50 µl

PCR condition

รอบที่ 1	94°C	60 วินาที
รอบที่ 2-30	94°C	45 วินาที
	55°C	15 วินาที
	72°C	30 วินาที
รอบที่ 31	94°C	60 วินาที
	55°C	15 วินาที
	72°C	5 นาที

ผลพีซีอาร์ หลังจากทำ agarose gel electrophoresis และ ethidium bromide staining แสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงผลพีซีอาร์โดยใช้ primers China 1 กับ China 2 (lanes 1-3) และ primers China 3 กับ China 4 (lane 4-6), lane 7 = DNA marker

2.3 การออกแบบ oligonucleotide probes ที่จำเพาะสำหรับ mutations ต่างๆ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณสมบัติ oligonucleotide probes ที่ใช้ในการทำ reverse dot blot hybridization

NAME	SEQUENCE (5' → 3')	Length	%G+C	Tm	จำนวนนิวคลีโอไทด์ A	G	C	T	Mutation
R1 N	CAGAGGTTCTTTGAGTCC	18	64.5	54	3	5	4	6	COD41/42 (-TCTT)
R1 M	CAAAGGACTCAACCTCTGG	19	67.6	58	6	4	6	3	COD41/42 (-TCTT)
R2 M	CCAGAGGTTCTTTTAGTC	18	62.2	52	3	4	4	7	COD43 (G-T)
R3 M	CCAGAGGTTTTTGAGTCC	18	64.5	54	3	5	4	6	COD41 (-C)
R4 N	GTGGGGCAAGGTGAAC	16	64.9	52	4	8	2	2	COD17 (A-T)
R4M	GTGGGGCTAGGTGAAC	16	64.9	52	3	8	2	3	COD17 (A-T)
R5 M	TTCATCCACGCTCACCTT	18	64.5	54	3	1	8	6	COD19 (A-G)
R6 N	ATACCAACCTGCCCAG	16	62.4	50	4	2	7	3	IVS1#1 (G-T)
R6 M	CTGGGCAGTTTGGTAT	16	59.8	48	2	6	2	6	IVS1#1 (G-T)
R7 N	CCTTGATACCAACCTGC	17	63.5	52	4	2	7	4	IVS1#5 (G-C)
R7 M	GCAGGTTGCTATCAAG	16	59.8	48	4	5	3	4	IVS1#5 (G-C)
R8 N	AGGAGAAGTCTGCCGTT	17	63.5	52	4	6	3	4	COD8/9 (+G)
R8 M	CGGCAGACCTTCTCCT	16	64.9	52	2	3	7	4	COD8/9 (+G)
R9 N	CAGGGCCTCACCACCA	16	67.5	54	4	3	8	1	COD26 (G-A)
R9 M	TTGGTGGTAAGGCCCT	16	62.4	50	2	6	3	5	COD26 (G-A)
R10 M	GGTGAGGCCCCTGG	14	65.5	50	1	7	4	2	COD27/28 (+C)
R11 N	CCTGTGGGGCAAGGTGA	17	68.3	56	3	8	3	3	COD15 (G-A)
R11 M	CCCTGTAGGGCAAGGTG	17	68.3	56	3	7	4	3	COD15 (G-A)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

NAME	SEQUENCE (5'--> 3')	Length	%CG	Tm	จำนวนเบส A	G	C	T	Mutation
R12 N	TCGGTGCCTTTAGTGAT	17	61.1	50	2	5	3	7	COD71/72 (+A)
R12 M	GGTGCCTTTAAGTGATG	17	61.1	50	3	6	2	6	COD71/72 (+A)
R13 N	GGTGGTCTACCCTTGGA	17	65.9	54	2	6	4	5	COD35 (C-A)
R13 M	TCCAAGGTTAGACCACC	17	63.5	52	5	3	6	3	COD35 (C-A)
R14 N	GGGTTAAGGCAATAGCAAT	19	63.2	54	7	6	2	4	IVS2#654 (C-T)
R14 M	ATTGCTATTACCTTAACCC	19	61.1	52	5	1	6	7	IVS2#654 (C-T)
R15 N	GGGCATAAAAGTCAGGG	17	63.5	52	6	7	2	2	-28 (A-G)
R15 M	CCCTGACTTCTATGCCC	17	65.9	54	2	2	8	5	-28 (A-G)
R16 M	CCCTGACTTTCATGCCC	17	65.9	54	2	2	8	5	-29 (A-G)
R17 M	CCTGACTTTTGTGCCC	16	62.4	50	1	3	6	6	-30 (T-C)
R18 M	AGGGCCTAACCACCAA	16	62.4	50	1	6	3	6	COD26 (G-T)
R19 N	GACAAGCTGCACGTGGA	17	65.9	54	5	6	4	2	COD95 (+A)
R19 M	TGCAGCTTTGTCACAGTG	18	62.2	52	3	5	3	7	COD95 (+A)
R20 N	TGCACTGGTGGGGTGAA	17	65.9	54	4	2	8	3	COD123-125(-ACCCCACC)
R20 M	GAATTCAGTGCAGGCTG	17	63.5	52	4	6	3	4	COD123-125 (-ACCCCACC)
R21 M	CTGGGCAGATTGGTAT	16	59.8	48	3	6	2	5	IVS1#1 (G-A)
R22 M	ATACCAACTTGCCCAGG	17	63.5	52	5	3	6	3	COD30 (AGG-AAG)
R23 N	CCTGTGGGGCAAGGTGA	17	68.3	56	3	8	3	3	COD14-15 (+G)
R23 M	CCCTGGTGGGGCAAGG	16	70.1	56	2	8	4	2	COD14-15 (+G)
R24 M	TGCCCTGGGGGCAAGG	16	70.1	56	2	8	4	2	COD15 (-T)
R25 M	CAGCCTGCCCTGGTGG	16	70.1	56	3	6	6	1	COD126 (GTG-GGG)
R26 N	GCCACACCCTAGGGTT	16	64.9	52	3	4	6	3	-86 (C-G)
R26 M	AACCCTACGGTGTGGC	16	64.9	52	3	5	5	3	-86 (C-G)
R27 N	CATCTATTGCTTACATTTG	19	58.9	50	4	2	4	9	CAP Site
R27 M	AAATGGAAGCAATAGATGG	19	61.1	52	9	6	1	3	CAP Site
R28 N	GCATAAAAGTCAGGGCAG	18	64.5	54	7	6	3	2	105 bp Del
R28 M	GCATAAAAGCCGTTACTG	18	62.2	52	6	4	4	4	105 BP DEL
R29 N	TGACTCCTGAGGAGAAGT	18	64.5	54	5	6	3	4	COD6 HBC
R29 M	GCAGACTTCTCCTTAGG	17	63.5	52	3	4	5	5	COD6 HBC (G-A)

2.4 การพัฒนาวิธี hybridization

2.4.1 ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำ hybridization

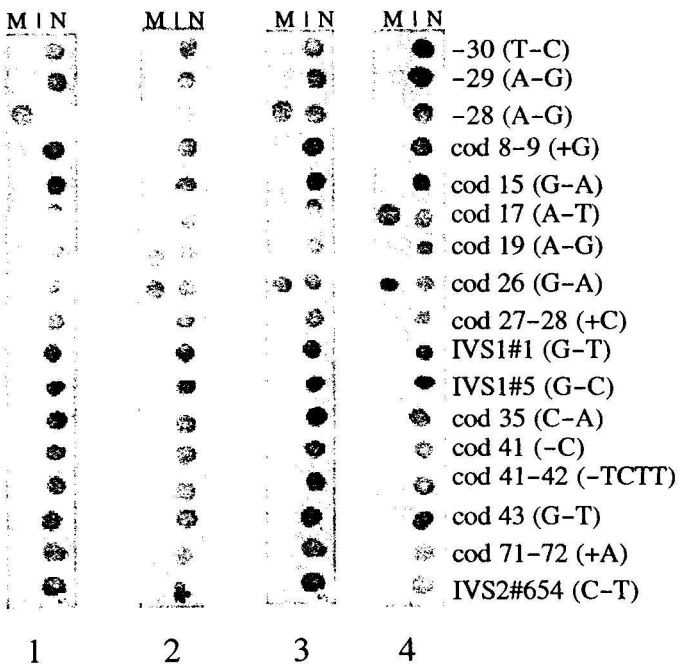
เวลาที่เหมาะสมคือเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนน้อยที่สุด ที่ยังคงให้ผลการทดสอบดีที่สุด คือผลการทดสอบมีความไวและความจำเพาะสูงสุด จากการทดลองในช่วงเวลาต่างกันพบว่าเวลาที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนคือ

- prehybridization ใช้เวลา 15 นาที
- hybridization ใช้เวลา 30 นาที
- streptavidin conjugation incubation ใช้เวลา 10 นาที

2.4.2 ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ hybridization

- hybridization temperature ที่เหมาะสมคือ 45°C
- washing temperature ที่เหมาะสมคือ 47°C
- ขั้นตอนอื่นๆทำที่อุณหภูมิห้อง คืออุณหภูมิประมาณ 25°C

ตัวอย่างผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 5



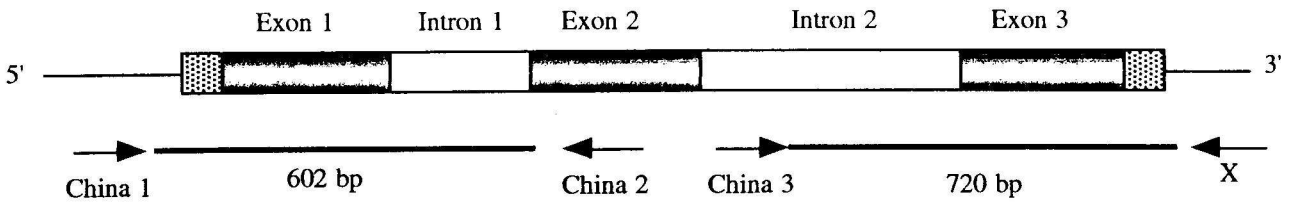
รูปที่ 5 แสดงภาพถ่ายจากผล reverse dot blot strips ในแต่ละ strip มี probes ที่จำเพาะสำหรับ mutations ต่างๆ 17 ชนิด โดยแถวด้านซ้ายเป็น mutant probe และแถวด้านขวาเป็น normal probe ของ mutation ชนิดนั้นๆ ผลคือ strip ที่ 1 เป็น homozygous -28 (A-G) mutation strip ที่ 2 เป็น compound heterozygote ของ cod 19 และ cod 26 strip ที่ 3 เป็น compound heterozygote ของ -28 และ cod 26 strip ที่ 4 เป็น compound heterozygote ของ cod 17 และ cod 26

M = mutant probe, N = normal probe

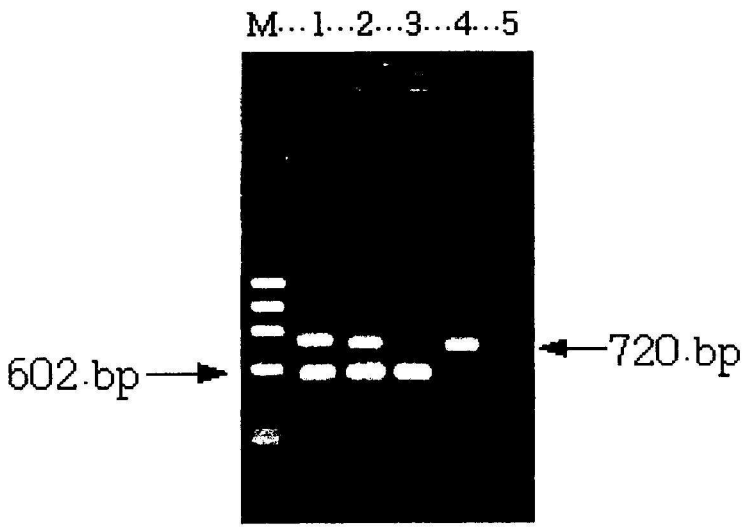
3. การพัฒนาวิธีทำพีซีอาร์โดยใช้ primer ทั้ง 2 ชุดในปฏิกิริยาเดียวกันเพื่อลดต้นทุน

โดยใช้ primers China 1 กับ China 2 และ primers China 3 กับ primer X (5'-AAA TGC ACT GAC CTC CCA CA-3') ซึ่งจะครอบคลุม exon 3 และตำแหน่ง poly A

ตำแหน่ง primers แสดงในไดอะแกรมรูปที่ 6 และ ผลพีซีอาร์แสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของ primers China 1, China 2, China 3 และ X บนบีตาโกลบินยีน และแสดงขนาดของ PCR ที่เกิดจาก primers ทั้ง 2 ชุด คือ ขนาด 602 เบส จาก primers China 1 และ China 2 และ 720 เบส จาก primers China 3 และ X



รูปที่ 7 แสดงผลพีซีอาร์โดยใช้ primers China 1 กับ China 2 และ primers China 3 กับ X ในปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน (lane 1 และ lane 2) เปรียบเทียบกับผลพีซีอาร์ที่แยกชุด primer คือ lane 3 เป็นผลของ primers China 1 กับ China 2 และ lane 4 เป็นผลของ primers China 3 กับ X

Lane 5 = Negative control และ M = DNA marker

4. ผลการทำ Hybridization ให้ผลเช่นเดียวกับการใช้ primer แต่ละชุดแยกทำปฏิกิริยา

5. ใช้เทคนิค reverse dot blot hybridization ตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียในพาหะและทารกในครรภ์

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ในคู่สามีภรรยาที่มีโอกาสมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จำนาน 16 คู่

ผลปรกติ	1	ราย
เป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมีย	4	ราย
เป็นโรคบีตาธาลัสซีเมียเมเจอร์	5	ราย
เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี	5	ราย
เป็นโรคบีตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอี	1	ราย

ครอบครัวที่	ผลการตรวจดีเอ็นเอ		
	สามี	ภรรยา	ทารกในครรภ์
1	HbE/Normal	COD41-42/Normal	COD41-42/Normal
2	COD19/Normal	IVS1#5/Normal	COD19/IVS1#5
3	HbE/Normal	COD19/Normal	HbE/Normal
4	COD19/Normal	COD41/Normal	COD19/Normal
5	COD17/Normal	COD19/Normal	COD17/COD19
6	COD19/Normal	IVS2#654/Normal	Normal/Normal
7	HbE/Normal	IVS1#5/Normal	IVS1#5/Normal
8	IVS1#5/Normal	HbE/Normal	HbE/Normal
9	COD41/Normal	COD19/Normal	COD41/COD19
10	HbE/Normal	COD19/Normal	HbE/Normal
11	IVS1#5/Normal	HbE/Normal	HbE/Normal
12	IVS1#1/Normal	COD19/Normal	COD19/IVS1#1
13	IVS1#5/Normal	COD41-42/Normal	IVS1#5/COD41-42
14	HbE/Normal	COD17/Normal	COD17/Normal
15	IVS1#5/Normal	HbE/Normal	HbE/Normal
16	COD17/HbE	HbE/Normal	COD17/HbE

ข้อวิจารณ์และข้อเสนอแนะ

เนื่องจากมิวเตชั่นของบีตาธาลัสซีเมียมีหลายชนิด ทั่วโลกมีรายงานแล้วเกือบ 200 ชนิด และในประเทศไทยพบแล้วประมาณ 20 ชนิด ชนิดและความถี่ของมิวเตชั่นในแต่ละภาคของประเทศพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะในภาคใต้จะมีความแตกต่างจากภาคอื่นอย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากในภาคใต้มีประชากรหลายเชื้อชาติอาศัยอยู่ร่วมกัน ทำให้การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอมีความยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานาน ถ้าตรวจด้วยวิธีดั้งเดิม ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ที่ต้องใช้ความรวดเร็วในการวินิจฉัย ต้องสามารวินิจฉัยได้ตั้งแต่อายุครรภ์น้อยๆ ในการวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจหามิวเตชั่น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจได้เร็ว ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ที่สำคัญคือสามารถตรวจหลายๆมิวเตชั่นได้พร้อมๆกัน เป็นการพัฒนาจากวิธี dot blot hybridization ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไปในการตรวจหามิวเตชั่น แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถตรวจได้หลายมิวเตชั่นในปฏิกิริยาเดียวกัน ต้องแยกตรวจทีละมิวเตชั่น ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย ถ้านำมาตรวจโรคที่เกิดจากมิวเตชั่นหลายชนิดอย่างบีตาธาลัสซีเมีย

ข้อแตกต่างระหว่างวิธีมาตรฐาน dot blot hybridization และ reverse dot blot hybridization คือ วิธี reverse dot blot hybridization จะใช้ oligoprobe มาดอทเรียงบนแผ่นไนลอนที่มีประจุเป็นลบจาก carboxyl group โดยโพรบแต่ละตัวจะติดฉลากด้วย amino group (NH_2) ซึ่งมีประจุเป็นบวก โพรบ 1 ตัวจะมีความจำเพาะต่อ 1 มิวเตชั่น ดังนั้นทำให้สามารถตรวจชนิดมิวเตชั่นหลายชนิดไปพร้อมๆกัน จากการวิจัยนี้สามารถตรวจได้ 17 มิวเตชั่นในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งจะครอบคลุม point mutation ทั้งหมดที่มีรายงานแล้วในภาคใต้ของประเทศ นอกจากนี้การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจผลของ hybridization โดยใช้ biotin-avidin reaction และ enzymatic color development ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สารกำมันตรังสี ทำให้สามารถนำมาใช้ได้ในการตรวจประจำวัน โดยไม่ต้องแยกห้องตรวจจากการทดสอบทั่วไป การเตรียม PCR product โดยติดฉลาก biotin กับ primer (biotinylated primer) ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและขั้นตอนในการทดสอบ ผลที่ได้มีประสิทธิภาพเหมือนกับการใช้ biotin-labelled dCTP

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการพัฒนาวิธี RDB นี้ คือการที่สามารถออกแบบ ASO probe ให้สามารถทำปฏิกิริยาได้ในภาวะเดียวกัน ซึ่งจากการวิจัยนี้ได้ทดลองออกแบบโพรบที่มี melting temperature ใกล้เคียงกัน และได้ทดลองในขั้นตอน hybridization และ stringency washing โดยเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆกัน จนได้อุณหภูมิที่เหมาะสม

เทคนิค RDB เป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่สลับซับซ้อน มีเครื่องพีซีอาร์และอ่างควบคุมอุณหภูมิ ก็สามารถทำวิธีนี้ได้ ซึ่งเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการตรวจประจำวัน และการตรวจวินิจฉัยบีตาธาลัสซีเมียก่อนคลอด ที่สามารถตรวจได้ตั้งแต่ไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์ น้ำยาที่ใช้โดยเฉพาะโพรบและไพรเมอร์มีความคงทน สามารเก็บได้เป็นปีโดยไม่เสียคุณสมบัติ ซึ่งเหมาะที่จะพัฒนาเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูป

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 1987;11:65-88.

2. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes. 3rd Ed, Blackwell, Oxford 1981.

3. Thein SL. β-thalassemia. In:Clinical Haematology. The Haemoglobinopathies. DR Higgs & DJ Weaherall (eds.). Bailliere Timdall, London 1993;6:151-75.

4. Laig M, Sanguansermsri S, Wiangnon J, Hundrieser M, Pape M, Flatz G. The spectrum of β-thalassemia mutations in northern and northeastern Thailand. Hum Genet 1989;84:47-50.

5. Thein SL, Winichagoon P, Hesketh C, Best S, Fucharoen S, Wasi P, Weatherall DJ. The molecular basis of β-thalassemia in Thailand: Amplication to prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1990;47:369-75.

6. Winichagoon P, Fucharoen S, Thonglairoam V, Tanapotiwirut V, Wasi P. β-thalassemia in Thailand. Ann N Y Acad Sci 1990; 612:31-42.

7. Fucharoen G, Fucharoen Sp, Jetsrisuparb A, Fukumaki Y. Molecular basis of Hb E-β-thalassemia and the origin of Hb E in northeast Thailand : idenification of one novel mutation using amplified DNA from buffy coat. Biochem Biophys Res Commun 1990; 170:698-704.

8. Saechan V, Panich V, Nopparatana C, Pornpatkul M, Laosombat V. The spectrum of β-thalassemia in Southern Thailand. Abstracts: First Annual Conference on Thalassemia Prevention and Control in Thailand. Faculty of Medicine, Prince of Sonkla University, Hat-Yai: 30 April 1993.

9. Petmitr S, Wilairat P, Kownkon J, Winichagoon P, Fucharoen S. Molecular basis of β^o - thalassemia/Hb E disease in Thailand. Biophys Res Commun 1989; 162:846-51.

10. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Morn GT, Erlich HA, Arnheim N. Emzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-4.

11. Saiki RK, Chang C-A, Levenson CH, Warren TC, Boehm CE, Kazazian HH Jr, Erlich HA. Diagnosis of sickle cell anemia and β-thalasemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med 1988; 319: 537-41.

12. Cai S-P, Chang CA, Zhang J-Z, Saiki RK, Elrich HA, Kan YW. Rapid prenatal diagnosis of β-thalassemia using DNA amplification and nonradioactive probes. Blood 1989; 73:372-4.

13. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of β-thalasemia : studies in Indian and Cypriot population in the UK. Lancet 1990; 336:834-7.

14. Winichagoon P, Kownkon J, Yenchitsomanus P, Thonglairoam V, Siritanarakul N, Fucharoen S. Detection of β-thalassemia and hemoglobin E genes in Thai by a DNA amplification tchnique. Hum Genet 1989; 82:389-90.

15. Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C and seven Mediterranean β-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: Application to prenatal diagnosis in Sicily. Blood 1993; 81:239-42.