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 โดยวิธีการดังกล่าวทำให้สามารถตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ได้รวดเร็วและสามารถตรวจได้หลายชนิดพร้อมๆกัน ในการทดลองนี้สามารถตรวจได้ 17 มิวเตชั่นในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว นอกจากนี้วิธีนี้มีข้อดีคือ ไม่ต้องใช้สารกำมันตรังสี ทำให้ประหยัดและมีขั้นตอนการทำที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน การพัฒนาวิธีนี้ที่ยากที่สุดคือการออกแบบ probe ให้สามารถทำปฏิกิริยาได้ในภาวะเดียวกันทั้ง 17 ชนิด ในการทดลองนี้สามารถทำได้โดยการออกแบบให้มีจำนวนและชนิด nucleotide ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยได้นำสาร formamide ใส่ในน้ำยาที่ใช้ทำปฏิกิริยาและน้ำยาที่ใช้ล้าง ASO-probe เพื่อลดอุณหภูมิในขั้นตอนการทดสอบให้สามารถทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องได้ เพื่อให้เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจหามิวเตชั่นของบีตาธาลัสซีเมียในการตรวจประจำวันได้

ภาษาอังกฤษ

Beta thalassemia is the most common genetic disease and a public health problem in Thailand. The disease is caused by various mutations of β-globin gene which nearly 200 mutations have been detected. A commonly 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. The method provides a rapid and simple procedure for screening of all point mutations of β-thalassemia which are simultaneous analyzed the entire series of sequence in a single hybridization reaction. It's 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 also added formamide in hybridization and washing solutions to decrease the melting temperature of the hybridization reaction. With these conditions we can perform the test at room temperature which will be useful for routine screening of β-thalassemia mutations.

คำหลัก (key words) ชุดตรวจยีน, บีตาธาลัสซีเมีย, มิวเตชัน, beta-thalassemia, asian mutations, diagnostic kit, molecular diagnosis, reverse dot blot