การระบุชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ด้วยวิธี Reverse Dot Blot Hybridization

Identification of α-thalassemia 2 by Reverse Dot Blot Hybridization

เกศรา นิตยบูรณ์ (Kesara Nittayaboon)* ดร.จำนงค์ นพรัตน์ (Dr.Chamnong Nopparatana)**

บทคัดย่อ

โรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) เป็นแอลฟาธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงปานกลาง จะตรวจพบฮีโมโกลบินเอช (Hb H, β_4) ในเลือดของผู้ป่วย โรคนี้เป็นปัญหาทางสาธารณะสุขที่สำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทย อุบัติการณ์ในประเทศไทยพบได้ประมาณ 7% และมีคู่สมรสที่เสียงต่อการมีบุตรเป็นโรคนี้ 26,000 คู่ต่อปี ทำให้มีโอกาสที่เด็กเกิดใหม่จะเป็นโรคนี้สูง การศึกษาในครั้งนี้เป็นการประยุกต์ใช้วิธี PCR และ reverse dot blot hybridization เพื่อตรวจหาความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบินในผู้ป่วยโรคเฮโมโกลบินเอช โดยใช้วิธี multiplex PCR เพิ่มปริมาณยีนของผู้ป่วยแล้วนำมาทำปฏิกิริยา hybridization กับ allele specific oligonucleotide probe ซึ่งเป็นตรึงอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยพบว่าผู้ป่วยโรคเฮโมโกลบินเอชในภาคใต้ส่วนมาก (80%) เป็นการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย1 ชนิด SEA ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย2 ชนิด 3.7 kb deletion (SEA deletion/3.7-kb deletion type I,-SEA/- $\alpha^{3.7\,I}$)

ABSTRACT

Hemoglobin H disease (Hb H disease) is an α-thalassemia of intermediate severity, which Hb H (β_4) can be found in patient's blood. This disease is an important health problem in Thailand. The prevalence of the disease in Thailand is about 7%. There are 26,000 couples at risk per year for having the children affected with the disease. Thus, the occasion of newborn with a Hb H disease still high level. In this study, we applied the PCR and reverse dot blot hybridization technic to detect α-globin gene mutation in Hb H patients. The multiplex PCR is used for amplifying the target fragment and then hybridized with allele specific oligonucleotide probe which are bound on a nylon membrane. We found that, major type of Hb H patients (80%) is α-thalassemia1 SEA type and α-thalassemia2 3.7 kb deletion (SEA deletion/3.7-kb deletion type I, -SEA/- $\alpha^{3.7\,I}$)

คำสำคัญ: แอลฟาธาลัสซีเมีย โรคฮีโมโกลบินเอช

Key Words: α-thalassemia, Hb H disease

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*

บทนำ

ธาลัสซีเมีย (Thalassemia, Thal) เป็นโรคโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมชนิดยีนด้อย (Autosomal Recessive) เกิดจากความผิดปกติของยีนที่สังเคราะห์สายฮีโมโกลบิน (Hemoglobin chain) ทำให้มีการผลิตฮีโมโกลบินลดลงหรือไม่สามารถผลิตได้เลย (Leung et al., 2008) โรคธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทยคือ แอลฟาธาลัสซีเมีย (α-thalassemia) และเบต้าธาลัสซีเมีย (β-thalassemia)

แอลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin gene) คนปกติจะมียีนแอลฟาโกลบิน 4 อัลลีล นั่นคือมียีน 2 อัลลีลบนโครโมโซมแต่ละข้าง ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (Fucharoen et al., 2011) การเกิด gene deletion หรือการเกิด point mutation ทำให้ยีนไม่สามารถแสดงออก หรือมีการแสดงออกของยีนแต่โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ (Leung et al., 2008) ส่วนเบต้าธาลัสซีเมีย (β-thalassemia) เกิดจากความผิดปกติในการสังเคราะห์สายเบต้าโกลบิน โดยอาจเกิดจาก point mutation หรือ deletion หรือ insertion ภายในบริเวณต่างๆ บนยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สาย β-globin ทำให้มีการสร้างสาย β-globin ลดลง (β^{+}-thalassemia) หรือหายไป (β^{o}-thalassemia) และเกิดพยาธิสภาพทั้งจากความไม่สมบูรณ์ของฮีโมโกลบินที่สร้างขึ้นและจากส่วนที่เป็น unmatched α-globin (ปราณี, 2541) สำหรับโรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) เป็นแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาธาลัสซีเมีย1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย2 ทำให้เหลืออัลลีลของยีนแอลฟาโกลบินเพียงอัลลีลเดียว ที่สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินได้ อุบัติการณ์การเกิดธาลัสซีเมียพบว่ามีการกระจายของโรคอยู่บริเวณเขตร้อนและบริเวณข้างเคียงของเขตร้อน สมมติฐานหนึ่งเชื่อว่า พาหะของโรคธาลัสซีเมียสามารถป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้ (Bernini et al., 1998) อุบัติการณ์การเกิดธาลัสซีเมียในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่า แอลฟาธาลัสซีเมียมีความถี่ร้อยละ 30-40 ในตอนเหนือของประเทศไทยและประเทศลาว ร้อยละ 4.5 ในประเทศมาเลเซีย ร้อยละ 5 ในหมู่เกาะที่ห่างไกลของประเทศฟิลิปปินส์ และเบต้าธาลัสซีเมียมีความถี่อยู่ระหว่างร้อยละ 1-9 (Fucharoen et al., 2005) ซึ่งชนิดของธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย เบต้าธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี และฮีโมโกลบินคอนสแตนด์ สปริงส์ (Hb Consatnt Spring) (Fucharoen et al., 2011) สำหรับในประเทศไทย ข้อมูลจากศูนย์ข้อมูลธาลัสซีเมีย ของกรม วิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่า การกระจายของแอลฟาธาลัสซีเมียมีความชุกมากที่สุดในภาคเหนือ คือร้อยละ 30 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือร้อยละ 20 ภาคกลางร้อยละ 20-25 และภาคใต้ร้อยละ 16

เนื่องจากผู้ที่มียีนธาลัสซีเมียมีทั้งผู้ที่แสดงอาการของโรค และไม่แสดงอาการของโรคโรค หรือเป็นพาหะ อาการที่แสดงออกแตกต่างกันไป ตั้งแต่มีโลหิตจางเล็กน้อย ไปจนถึงโลหิตจางมากจนเสียชีวิตตั้งแต่ในครรภ์ หรือหลังคลอดได้ไม่นาน ส่วนผู้ที่เป็นพาหะ ถึงแม้จะไม่มีอาการ แต่สามารถถ่ายทอดยีนได้ ซึ่งแต่ละปีในประเทศไทยพบหญิงตั้งครรภ์ที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นธาลัสซีเมียประมาณ 5 หมื่นคน (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค, 2554) และมีเด็กเกิดใหม่ที่ป่วยเป็นโรค 12,125 คนต่อปี ในจำนวนนี้มีเด็กที่เป็นฮีโมโกลบินเอช ถึง 7,000 คน และคนไข้ฮีโมโกลบินเอช ที่ยังมีชีวิตอยู่มีมากถึง 420,000 คน (สุทัศน์,ปราณี, 2537) ธาลัสซีเมียจึงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งไม่เพียงแต่ส่งผลต่อตัวผู้ป่วยและครอบครัวเท่านั้น แต่ยังส่งผลต่อเศรษฐกิจอีกด้วย เนื่องจากค่ารักษาในการให้เลือดแต่ละครั้งสูง อีกทั้งเป็นโรคที่รักษาไม่หาย แต่สามารถควบคุมและป้องกันการถ่ายทอดไปสู่ลูกได้ นอกจากนั้นชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมียที่พบในประเทศไทยยังมีความหลากหลาย ทำให้ไม่มีการทดสอบใดการทดสอบหนึ่งในห้องปฏิบัติการที่สามารถตรวจชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมียได้ครอบคลุมทุกชนิด ดังนั้น การ

ทราบชนิดที่แน่นอนของการกลายพันธุ์มีความสำคัญมากที่จะทำให้สามารถควบคุมและป้องกันโรคได้ การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยชนิดการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียจึงมีความสำคัญ

เทคนิค Reverse dot blot hybridization เป็นการตรวจหาชนิดการกลายพันธุ์ของยีนได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว (Old, 2003) โดยมีหลักการคือ สร้างโพรบ (probe) ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์แต่ละชนิด ที่มีปลายด้าน 5' เป็นหมู่อะมิโน (NH_2) นำมาตรึงบนแผ่นไนลอน (nylon membrane) ที่มีประจุลบ แล้วนำ DNA ของผู้ป่วยที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) มาทำปฏิกิริยาเข้าคู่ (hybridization) กับโพรบ ตรวจวัดผลด้วยการดูสีจากปฏิกิริยาของเอนไซม์และสารตั้งต้น (ปราณี,สุทัศน์, 2541)

วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค reverse dot blot hybridization ในการตรวจหาชนิดของการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอช เพื่อนำไปสู่การควบคุมและป้องกันโรค

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 50 คนที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (รหัสโครงการ 57-005-04-6-2) โดยเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำของผู้ป่วย ใส่ในหลอดปลอดเชื้อที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA นำส่งห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยาของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ เพื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบิน ด้วยเครื่อง automated Hb-HPLC analyzer (Variant™; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง จะเลือกตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคเฮโมโกลบินเอช ที่มี ค่า MCV น้อยกว่า 75 fL MCH น้อยกว่า 25 pg ค่า Hb น้อยกว่า 11 g/dL ในผู้ชาย หรือน้อยกว่า 10 g/dL ในผู้หญิง และมีผลการตรวจ Hb typing เป็น A_2A H, A_2A Bart's H, CS A_2A, CS A_2A Bart's, CS A_2A Bart's H อายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป ไม่จำกัดเพศ อายุ และเชื้อชาติ ซึ่งตัวอย่างเลือดได้มาจากเลือดที่เหลือจากการส่งตรวจประจำวัน

การเตรียม DNA

เตรียม DNA โดยการสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ใช้ชุดสกัด (Geneaid Genomic DNA minikit (blood/cultured cell))

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR (allele-specific PCR)

ไพรเมอร์สำหรับ multiplex PCR จะมีการออกแบบ 2 ชุด คือชุดไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนอัลลีลปกติ (normal) จะออกแบบให้สามารถเข้าคู่กันได้กับอัลลีลปกติ และชุดไพรเมอร์ที่ผิดปกติ (mutant) จะออกแบบให้สามารถเข้าคู่ได้กับอัลลีลที่ผิดปกติ โดยจะมีการติดฉลากที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ด้วยไบโอติน (biotin) ลำดับเบสของไพร์เมอร์และขนาดของผลพีซีอาร์แสดงในตารางที่ 1

การออกแบบโพรบ (Oligonucleotide probes)

โพรบสำหรับการทดลอง reverse dot blot hybridization จะออกแบบ 2 ชุด คือชุดโพรบสำหรับอัลลีลปกติ จะออกแบบให้สามารถเข้าคู่กันได้กับ DNA ที่ปกติ และชุดโพรบสำหรับอัลลีลที่ผิดปกติจะออกแบบให้สามารถเข้าคู่กับ DNA ที่มีการกลายพันธุ์ ลำดับเบสของโพรบที่ใช้ในการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 2

การเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธี Multiplex PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายด้วยวิธี Multiplex PCR โดยแยกปฏิกิริยาเป็น 2 แบบ คือปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มจำนวนยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย1 (ชนิด SEA และ THAI deletion) รวมถึงบริเวณ exon 3 ของยีนแอลฟาโกลบิน เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์เฉพาะจุด และปฏิกิริยา PCR

สำหรับเพิ่มจำนวนยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย2 (ชนิดยีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบสและ 4.2 กิโลเบส)

ปฏิกิริยาการ Hybridization (Reverse dot blot hybridization)

วิธี reverse dot blot เป็นการตรวจหาชนิดของการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยนำผลพีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วยไบโอตินมาทำปฏิกิริยากับโพรบที่ตรึงอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรน หลังจากนั้นตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารตั้งต้น (liquid NBT (nitroblue tetrazolium) / BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Boehringer - Mannheim)) และอ่านผลโดยการดูสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นเมมเบรน (Maggio et al., 1993; Nopparatana et al., 1994; Lin et al., 2012)

ผลการวิจัย

การเตรียมดีเอ็นเอ

ตรวจวัดคุณภาพการสกัดดีเอ็นเอโดยการวิเคราะห์ใน 1% gel electrophoresis และการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ชนิดการกลายพันธุ์	ชื่อ	ลำดับเบส (5' -> 3')	ผลพีซีอาร์
-SEA	SEA 1F	5'- Biotin-CTT CGC AGG AAC TCG GTC GTC-3'	normal: SEA3F+SEA2R = 541 bp
	SEA 2R	5'-Biotin-GCT AGT CGG GAG GCT GA -3'	mutant: SEA1F+SEA2R = 389 bp
	SEA 3R	5'- Biotin-TAG TT GGC GCC GAC AGC -3'	
	A1B	5'-GTT CCC TAG GCC CCG ACA CG -3'	normal: SEA1F+A1B = 249 bp
-THAI	C2	5'-Biotin-CAG AAC CTA CCC AFA GGT G-3'	mutant :C2+C3 = 460 bp
	C3	5'-CCC CTG ACA ATC TCA TCA CTC -3'	
exon 3 of α_2	CSF	5'-(Biotin)-CTG CAC AGC TCC TAA GCC AC -3'	normal/mutant : CSF+Z =305 bp
	Z	5'-CCA ACA ATG GAG GTG TTT AC-3'	
-α 3.7	A	5'-CTG TCC TTT CCC TAG CCA GAG CCA-3'	normal : A+Z = 1,850 bp
	B	5'-Biotin-CCA TGC CTG GCA CGC TTT GCT GAG-3'	mutant : A+B = 1,937 bp
	Z	5'-CCA ACA ATG GAG GTG TTT AC-3'	
-α 4.2	E	5'-CCC TGG GTG TCC AGG AGC AAG CC-3'	mutant :G+E = 1,762 bp
	G	5'-Biotin-CCG GTT TAC CCA TGT GGT GCC TC-3'	

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของโพรบที่ใช้ในปฏิกิริยาการ hybridization (Reverse dot blot hybridization)

Name of probe	type	sequences (5' -> 3')
SEA	Mutant	5'-NH_2-AGG TTC ACT TGG AGG C -3'
SEA1	Normal	5'-NH_2-CCC ATA TCG CAC AAA GA -3'
SEA2	normal	5'-NH_2- CCA GGA GTT CCC AAG AA -3'
THAI	Mutant	5'-NH_2-AGC CCT TGA GCC GCG -3'
CSN	Normal	5'- NH_2-TAC CGT TAA GCT GGA GCC T -3'
-α 4.2	Mutant	5'- NH_2-CAG CAC CTT CTC TTG AGC A-3'
CSN	Normal	5'-NH_2-TAC CGT TAA GCT GGA GCC T -3'
CSM	Mutant	5'-NH_2-TAC CGT CAA GCT GGA GCC T -3'
PSM	Mutant	5'-NH_2-TAC CGT TAT GCT GGA GCC T -3'
QSN	Normal	5'-NH_2- ACC GTG CTG ACC TCC A -3'
QSM	Mutant	5'-NH_2- ACC GTG CCG ACC TCC A -3'
SDN	Normal	5'-NH_2- ACT GCC TGC TGG TGA C -3'
SDM	Mutant	5'-NH_2- ACT GCC TGC GGG TGA C -3'
RT1	Normal	5'-NH_2- AGT GCG GCC CAG GCC-3'
RT2	Mutant	5'-NH_2- GGC CGA GGG CCC AGG-3'
RT3	Normal	5'-NH_2- AGG AGG AAC GGC TAC -3'
RT4	Mutant	5'-NH_2- AAG AAG CAT GGC CAC-3'
RT5	Normal	5'-NH_2- CAG AGA GAA CCC AGG-3'
RT6	Mutant	5'-NH_2- GGG AAA AAA CTC AGG-3'

การเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธี Multiplex PCR

จากผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีนบริเวณแอลฟาโกลบินยีนได้ โดยผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ จะนำไปทำปฏิกิริยาเข้าคู่กันของดีเอ็นเอและโพรบในขั้นตอนต่อไป เพื่ออ่านผลความผิดปกติของยีน

ผลการทำปฏิกิริยาการ hybridization (Reverse Dot Blot Hybridization)

ผลการทำปฏิกิริยา hybridization แสดงในรูปที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดซับซ้อนต่างๆ ซึ่งผลการ hybridization ในกลุ่มตัวอย่าง จะมีการเปรียบเทียบกับผลการ hybridization ด้วยดีเอ็นเอควบคุม ที่ทราบชนิดของการกลายพันธุ์แต่ละชนิดอยู่แล้ว

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธี reverse dot blot hybridization สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอช ตารางที่ 3 แสดงความถี่ของยีนที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยในการวิจัยครั้งนี้พบว่าผู้ป่วยส่วนมาก (80%) มีการกลายพันธุ์แบบแอลฟาธาลัสซีเมีย1 ชนิด SEA ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย2 ชนิดยีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ชนิดที่ 1 (SEA deletion/3.7-kb deletion,–SEA/-$\alpha^{3.7\,I}$) รองลงมา (8 %) คือ การกลายพันธุ์แบบแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สปริง (SEA deletion/Hb CS,

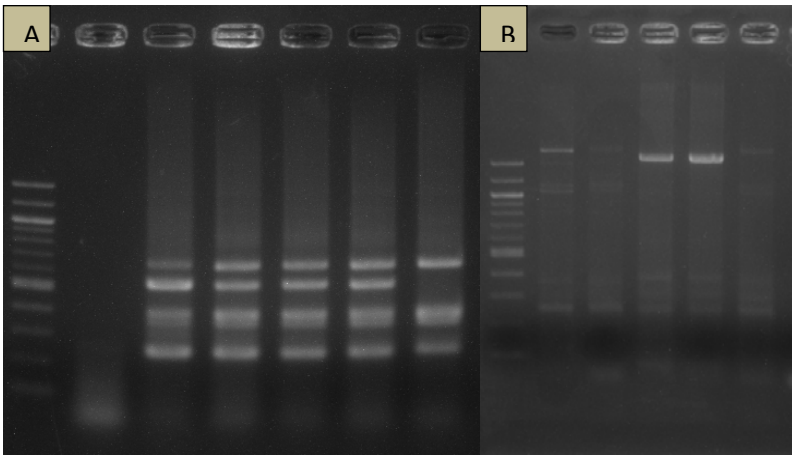
–SEA/$\alpha^{CS}\alpha$) ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ สอดคล้องกับผลการทดลองในภาคกลาง (Laosombat et al., 2009) แต่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Boonsa et al., 2004) พบว่ามีการกลายพันธุ์ของแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA ร่วมกับแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สปริง (SEA deletion/Hb CS ,–SEA/$\alpha^{CS}\alpha$)มากกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะแต่ละภูมิภาคมีการกระจายตัวของแอลฟาธาลัสซีเมียต่างชนิดกัน (Fucharoen et al., 2009) จากผลการศึกษา ยังพบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ไม่สามารถระบุชนิดของการกลายพันธุ์ได้ เป็นเพราะยังมีการกลายพันธุ์ที่ยังไม่ทราบชนิดอื่นๆ ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยวิธีนี้

การวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ระบุชนิดของการกลายพันธุ์ของแอลฟาธาลัสซีเมียแต่ละชนิดได้ ซึ่งการทราบชนิดของการกลายพันธุ์มีประโยชน์อย่างมากในการอธิบายอาการของโรค ทำให้สามารถวางแนวทางในการรักษาผู้ป่วยและเฝ้าระวังผู้ป่วยในช่วงวิกฤติได้

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีนด้วยวิธี Reverse Dot Blot Hybridization เหมาะสำหรับการกลายพันธุ์เฉพาะจุดมากกว่า แต่จากผลการศึกษาพบว่าสามารถประยุกต์ใช้กับการกลายพันธุ์แบบยีนขาดหายไปได้ อีกทั้งวิธีที่ใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนแบบขาดหายไปที่ทำโดยทั่วไปเช่น วิธี gap-PCR สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์แบบยีนขาดหายไปได้เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดได้ แต่เมื่อนำมาประยุกต์ใช้วิธีนี้แล้ว จะสามารถตรวจการกลายพันธุ์ทั้งแบบยีนขาดหายไปและการกลายพันธุ์เฉพาะจุดได้ในคราวเดียวกัน ทำให้ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ได้

กิตติกรรมประกาศ

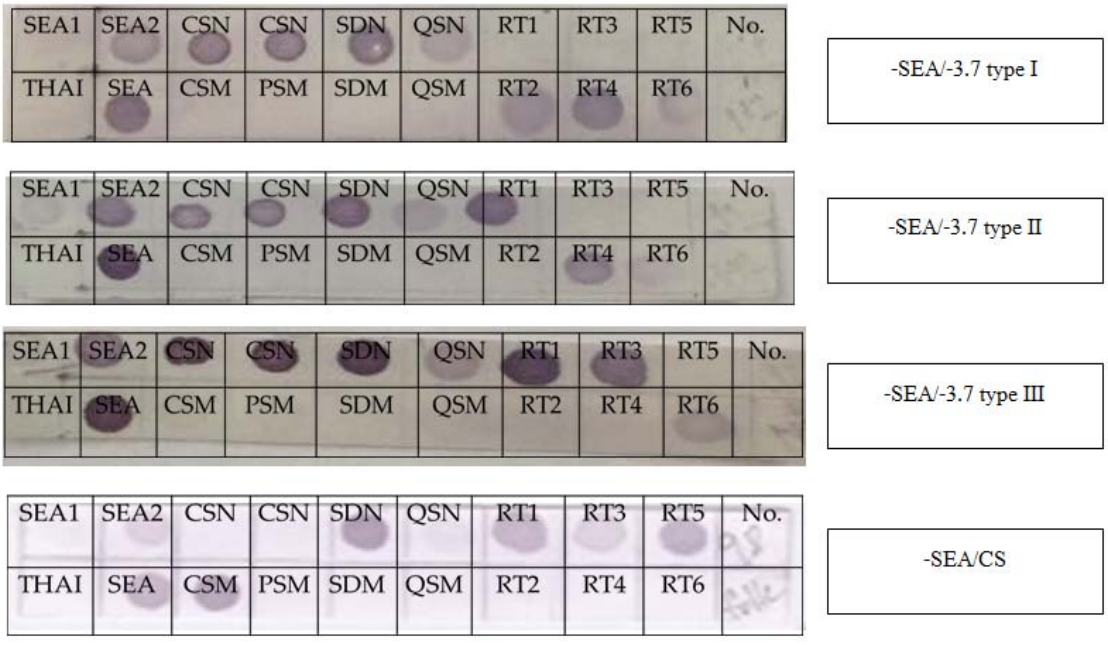
การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และทุนวิจัยจากภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์



รูปที่ 1 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน โดยรูป A เป็นการเพิ่มจำนวนยีนด้วยไพรเมอร์ชุดสำหรับเพิ่มจำนวนยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย1 และรูป B เป็นการเพิ่มจำนวนยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย2

ตารางที่ 3 แสดงความถี่ของยีนของผู้ป่วยโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอชที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 50 ราย

α-globin genotype	Number of patients (%)
Deletional HbH disease	
SEA deletion/3.7-kb deletion type I (–SEA/-$\alpha^{3.7\,I}$)	40 (80%)
SEA deletion/3.7-kb deletion type II (–SEA/-$\alpha^{3.7\,II}$)	2 (4 %)
SEA deletion/3.7-kb deletion type III (–SEA/-$\alpha^{3.7\,III}$)	1 (2 %)
SEA deletion/ unknown	1 (2 %)
Unknown/3.7-kb deletion type I (–SEA/-$\alpha^{3.7\,I}$)	2 (4 %)
Nondeletional HbH disease	
SEA deletion/CS (–SEA/$\alpha^{CS}\alpha$)	4 (8 %)
Total	50(100%)



รูปที่ 2 แสดงผลการทำปฏิกิริยาการ hybridization ด้วยวิธี Reverse Dot Blot Hybridization

เอกสารอ้างอิง

ปราณี (วินิจจะกุล) ฟู่เจริญ,สุทัศน์ ฟู่เจริญ, บรรณาธิการ. ธาลัสซีเมีย การตรวจวิเคราะห์ยีน ด้วย เทคนิค PCR. กรุงเทพมหานคร: โครงการ วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล. 2541.

สุทัศน์ ฟู่เจริญ, ปราณี (วินิจจะกูล) ฟู่เจริญ. Thalassemia and hemoglobinopathies. ใน : ถนอมศรี ศรีชัยกุล, แสงสุรีย์ จูฑา, บรรณาธิการ. ตำราโลหิตวิทยา การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ทีพี พริ้นท์; 2537.

Arica V, Arica SG.. Alpha thalassemia disorders. Faculty of Medicine, Mustafa Kemal University. 2012.

Boonsa S, Sanchaisuriyab K, Fucharoen G, Wiangnon S, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. .The Diverse Molecular Basis and Hematological Features of Hb H and AEBart's Diseases in Northeast Thailand. Acta Haematol 2004;111:149–154.

Chui DHK, Fucharoen F, Chan V.. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Blood 2003; 101: 791-800.

Fucharoen S, Winichagoon P.. Thalassemia and Abnormal Hemoglobin. Int J Hematol 2002, 76.2: 83-9.

Fuchareon S, Viprakasit V..Hb H disease: clinical course and disease modifiers. Am J Hematol 2009;1: 26-34.

Fuchareon S, Winichagoon P. Haemoglobinopathies in Southeast Asia. The Indian Journal of Medical Research 2011; 498 – 506.

Higgs DR, Steinberg MH, Forget BG, Weatherall DJ (บรรณาธิการ) Disorders Of Hemoglobin พิมพ์ครั้งที่ 2 เมืองเคมบริดจ์ อังกฤษ 2009; 239-295.

Laosombat V,Viprakasit V,Chotsampanchareon T, et al. Clinical features and molecular analysis in Thai patients with Hb H disease. Ann Hematol 2009; 88: 1185-92.

Leung WC, Leung KY, Lau ET, Tang MHY, Chan V. Alpha-thalassaemia. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine 2008; 13(4): 215-222.

Lin M, Zhu LL, Wang Q, Xie LX, Lu M, Wang JL, et al.. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simulataneous detection of common alpha and beta thalassemia in Chinease. Blood Cells Mol Dis 2012; 48.2: 86-90.

Maggio A, Giambona A, Cai S P, . . ., Chehab FF. "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 1993; 81(1): 239-242.

Nopparatana, C., V. Panich, V. Saechan, V.,. . ., Y. Fukumaki. The spectrum of beta-thalassemia mutations in southern Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health 1994; 26: 229-234.

Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. Blood Review. 2003; 17: 43-53.

Vichinsky E. Advance in the treatment of alpha-thalassemia. Blood rev 2012; 26S : S31-S34.