Thesis title : Alpha Thalassemia Gene in Northern Thailand : Incidence of Deletional and Hemoglobin Constant Spring Types.

Author : Miss Thasaneeya Chamrasratanakorn

Master of Science : Biochemistry

Examining Committee :

Associate Professor Dr.Torpong Sanguansermsri .....Chairman

Associate Professor Dr.Panja Kulapongs .....Member

Assistant Professor Dr.Vichai Wongchai .....Member

Assistant Professor Luksana Makonkawkeyoon .....Member

ABSTRACT

In the present investigation, the molecular basis and the prevalence of the alpha thalassemia genes : deletional types and the hemoglobin Constant Spring were studied by DNA hybridization technique. Venous blood 3-5 ml was collected from 112 males,aged 21 years in four districts of Chiang Mai : 19 samples from Jomtong, 49 samples from Smeang, 19 samples from Mae Tang and 25 samples from Prou. The whole blood was transfered to Hannover,Federal Republic of Germany in frozen state and DNA was isolated from this preparation by phenol/chloroform extraction.

For the study of deletional types : 3-5 ug of DNA was digested with the restriction enzyme Bam HI and Bgl II. DNA fragments were separated by gel electrophoresis and transffered to nitrocellulose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

membranes by Southern blotting technique. The membranes were hybridized with the ^{32}P-labelled alpha$_2$ probe and the zeta probe which were isolated from recombinant plasmid pEMBL α_2 and pEMBLζ respectively. When hybridization the Bam HI digested DNA with the alpha$_2$ probe, the normal DNA produced a 14.1 kb fragment, whereas a 10.3 or 10.5 kb fragment was generated when one of the two alpha globin gene loci was deleted. The rightward and the leftward chromosomes could be distinguished by Bgl II digestion and hybridization with the alpha$_2$ probe, the rightward chromosome produced a 16.0 kb fragment while the leftward one showed a 7.3 kb fragment. The Southeast Asia alpha-thal-1 was characterized by a 18.5 kb fragment instead of the 8-11kb fragment when hybridization the Bam HI digested DNA with the zeta probe.

Samples with rightward deletion were subtyped by the digestion of restriction enzymes Rsa I, Apa I and hybridized with the alpha$_2$ probe. The alpha-thal-1 samples were subtyped by the consecutive digestion of Bam HI and Bgl II, then hybridized with the zeta probe. The difference fragment revealed the exact extent of the deletion at the 3'terminus of the pseudozeta gene. The Rsa I polymorphic site was studied in every samples by hybridization the Rsa I digested DNA with the alpha$_2$ probe.

In order of the entire zeta alpha gene cluster deletion detection, samples that do not exhibited the alpha deletion and showed the homozygosity for Rsa I polymorphic site were digested with Hind III and hybridization with the Lo probe which was isolated from the recombinant plasmid pUC13Lo. The normal DNA produced a 13 kb fragment

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

whereas the deleted chromosome showed a 20 kb fragment.

For Hemoglobin Constant Spring detection, the Rsa I digested DNA was hybridized with the normal and mutated oligonucleotide probes (CS^{nml}, CS^{mut}).

Among 112 DNA samples, 45 were shown to carry alpha globin gene anormalies. There were 33 samples of alpha-thal-2 (haplotype frequency = 0.183), 25 of these were heterozygotes and 8 were homozygotes. Four of the heterozygotes were leftward deletion (haplotype frequency = 0.018) and the other were rightward deletion subtype I (haplotype frequency = 0.165).

The alpha-thal-1 was observed in 13 cases (haplotype frequency = 0.058), 12 of these were subtype I and the other was subtype II. One of the Hb H disease was observed, resulted from the combination of alpha-thal-1 and rightward deletion chromosomes. The large deletion of zeta alpha gene cluster was not found in this investigation.

The Rsa I polymorphic site was found both among the nonthalassemic chromosome (54/170) and the thalassemic one (3/37).

Four of the hemoglobin Constant Spring were observed (haplotype frequency =0.018), 2 of these were combined with alpha-thal-2 deletion.

The frequency of severe alpha-thalassemia was calculated due to the haplotype frequencies : Hb Bart's hydrops fetalis 0.0034 = 1:300, Hb H disease 0.0212 = 1:47 and Hb CS-Hb H disease 0.0021 = 1:476.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ : อัลฟาธาลัสซีเมียยีนในเขตภาคเหนือของประเทศไทย : อุบัติการของชนิดที่มีการขาดหายของยีน และชนิดฮีโมโกลบินคอนแสตนท์สปริง

ชื่อผู้แต่ง : นางสาว ทัศนียา จำรัสรัตนกร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต : สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ.นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี .....ประธานกรรมการ

รศ.นพ.ปัญจะ กุลพงษ์ .....กรรมการ

ผศ.ดร.วิชัย วงศ์ไชย .....กรรมการ

ผศ.ลักษณา มกรแก้วเกยูร .....กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะทำการศึกษาถึงลักษณะและอุบัติการของอัลฟาธาลัสซีเมียยีนชนิดต่างๆ โดยเน้นศึกษาเฉพาะชนิดที่มีการขาดหายของยีน และความผิดปกติแบบฮีโมโกลบินคอนแสตนท์-สปริง โดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ตัวอย่างเลือด 3-5 มิลลิลิตร เก็บจากทหารจำนวน 112 ราย ในเขต 4 อำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ : 19 รายจากจอมทอง 49 ราย จากสะเมิง 19 ราย จากแม่แตง และอีก 25 รายจากพร้าว ตัวอย่างเลือดทั้งหมดถูกนำไปยังเมืองฮันโนเวอร์ในลักษณะแช่แข็ง และทำการแยกสะกัดดีเอ็นเอด้วยสารฟีนอลและคลอโรฟอร์ม

ในการศึกษาถึงลักษณะการขาดหายของอัลฟาธาลัสซีเมียยีน นำดีเอ็นเอ 3-5 ไมโครกรัมมาตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะแบมเอชวัน และบีจีแอลทู และนำมาไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบจำเพาะอัลฟาสอง หรือ ซีตา ที่แยกออกมาจากพลาสมิด pEMBLα_2 และ pEMBLζ

ดีเอ็นเอปกติเมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะแบมเอชวันและไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบจำเพาะอัลฟาสองจะได้แถบดำ ขนาด 14.1 กิโลเบส ในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีการขาดหายของอัลฟายีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใดยีนหนึ่งจะพบแถบดำที่ขนาด 10.3 หรือ 10.5 กิโลเบส การขาดหายของอัลฟายีนชนิดนี้มีได้สองลักษณะ คือ ลักษณะที่ขาดอัลฟายีน-2 (เลฟเวอร์ด) และลักษณะที่ขาดท่อนรวมระหว่างยีนอัลฟาทั้งสอง (ไรท์เวอร์ด) ซึ่งแยกได้โดยการตัดดีเอ็นเอเหล่านี้ด้วยเอ็นไซม์จำเพาะบีจีแอลทู และไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบจำเพาะอัลฟาสอง ดีเอ็นเอที่มีการขาดหายของยีนในลักษณะไรท์เวอร์ดจะพบแถบดำที่ขนาด 16 กิโลเบส ในขณะที่ลักษณะเลฟเวอร์ดจะพบขนาด 7.3 กิโลเบส การขาดหายของยีนอัลฟาไปทั้งสองตำแหน่งในลักษณะเซาท์อีสต์เอเชีย ($--^{SEA}$) จะตรวจพบได้โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์จำเพาะแบมเอชวัน และนำมาไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบจำเพาะซีตาจะได้แถบดำที่ขนาด 18.5 กิโลเบสแทนขนาด 8-11 กิโลเบสที่พบในดีเอ็นเอปกติ

ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีการขาดหายของยีนแบบไรท์เวอร์ด จะนำมาศึกษาถึงลักษณะกลุ่มย่อย โดยการใช้เอ็นไซม์จำเพาะอาร์เอสเอวันและอปาวันตัด และไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบจำเพาะอัลฟาสองจะได้ขนาดท่อนดีเอ็นเอต่างกันในแต่ละกลุ่มย่อย ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการขาดหายในลักษณะเซาท์อีสต์เอเชียจะถูกนำมาศึกษาถึงลักษณะกลุ่มย่อยโดยใช้เอ็นไซม์จำเพาะแบมเอชวันร่วมกับบีจีแอลทู และไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบจำเพาะซีตาจะพบแถบดำมีขนาดตามความแตกต่างของท่อนปลาย 3' ซูโดซีตายีนในแต่ละกลุ่มย่อย ในการศึกษาถึงตำแหน่งตัดพิเศษของเอ็นไซม์จำเพาะอาร์เอสเอวันบนโครโมโซมของกลุ่มอัลฟายีน จะตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์จำเพาะอาร์เอสเอวันและไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบจำเพาะอัลฟาสอง ดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งตัดต่างกันจะได้ท่อนดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกันด้วย

ดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความผิดปกติของการขาดหายของยีนและมีตำแหน่งการตัดของเอ็นไซม์จำเพาะอาร์เอสเอวันเหมือนกันในทั้งสองโครโมโซม จะนำมาศึกษาว่ามีอัลฟายีนครบทั้ง 4 ตำแหน่งหรือไม่โดยใช้เอ็นไซม์จำเพาะฮินด์ทรี และไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบจำเพาะแอลฟูนย์ที่แยกมาจากพลาสมิด pUC13LO ดีเอ็นเอปกติจะพบแถบดำที่ขนาด 13 กิโลเบสในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีการขาดหายไปทั้งหมดของกลุ่มซีตาอัลฟายีนจะพบท่อนขนาด 20 กิโลเบส ($--^{THAI}$)

จากตัวอย่างดีเอ็นเอ 112 ตัวอย่าง มี 45 รายแสดงความผิดปกติของอัลฟายีนเป็นความผิดปกติชนิดอัลฟาธาลัสซีเมียสอง 33 ราย (ความถี่ยีน 0.183) ในจำนวนนี้พบว่า 25 รายเป็นเฮทเทอโรไซโกท และ 8 รายเป็นโฮโมไซโกท 4 รายในกลุ่มเฮทเทอโรไซโกท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นการขาดหายของยีนลักษณะเลฟเวอร์ด (ความถี่ยีน 0.018) ตัวอย่างไรท์เวอร์ดทั้งหมดเป็นกลุ่มย่อยกลุ่มที่ 1 ความผิดปกติชนิดอัลฟาธาลัสซีเมียหนึ่งลักษณะเซาท์อีสต์เอเชียพบ 13 ราย (ความถี่ยีน 0.058) 12 รายในจำนวนนี้เป็นกลุ่มย่อยกลุ่มที่ 1 ที่เหลือเป็นกลุ่มที่ 2 พบฮีโมโกลบินเอช 1 ราย เกิดจากการขาดหายของยีนในลักษณะไรท์เวอร์ดอัลฟาธาลัสซีเมียสองร่วมกับลักษณะเซาท์อีสต์เอเชียอัลฟาธาลัสซีเมียหนึ่ง ($--^{SEA}$ / $-\alpha^{3.7}$) ไม่พบลักษณะการขาดหายไปทั้งกลุ่มของอัลฟายีน ($--^{THAI}$) ในการศึกษาตำแหน่งตัดพิเศษของเอ็นไซมีอาร์เอสเอวันพบทั้งในโครโมโซมที่ปกติ (54/170) และโครโมโซมที่มีความผิดปกติ (3/37)

พบยีนที่มีมิวเตชั่นลักษณะคอนแสตนท์สปริง 4 ราย (ความถี่ยีน 0.018) 2 รายมีความผิดปกติลักษณะอัลฟาธาลัสซีเมียสองร่วมด้วย ($\alpha\alpha^{CS}$ / $-\alpha^{3.7}$ และ $\alpha\alpha^{CS}$ / $-\alpha^{4.2}$)

คำนวณอัตราเสี่ยงการเป็นอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงจากความถี่ยีนได้ว่า : ภาวะ Hb Bart's hydrops fetalis (0.0034) = 1:300 ภาวะ Hb H disease (0.0212) = 1:47 และ Hb CS-Hb H disease (0.0021) = 1:476

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved