Thesis Title : Hemoglobin Constant Spring in Northern Thailand Populations : Molecular Screening by Amplified Created Restriction Site.

Author : Mr. Wirote Tuntiwechapikul

M.Sc. : Biochemistry

Examining Committee :

Assistant Professor Dr. Luksana Makonkawkeyoon	Chairman
Assistant Professor Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Member
Dr. Wasun Chantratita	Member
Dr. Nopporn Sittisombut	Member

Abstract

Hemoglobin Constant Spring (Hb CS) is an α-thalassemic hemoglobinopathy that resulted from a mutation in the termination codon of α_2-globin gene. Continued translation of α_2-mRNA past this locus into 3' noncoding region destabilizes the α^{CS}-mRNA and causes the thalassemic phenotype. The interaction of the Hb CS gene with deletional α-thalassemia (--/$\alpha^{CS}\alpha$) is the major cause of Hb H disease in Thailand and is usually more severe than deletional Hb H disease (--/-α), with some patients being transfusion dependent. Therefore, the reliable detection of this gene is useful for the genetic counseling and prenatal diagnosis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In the present study, a new method to detect Hb CS gene has been introduced. First, selective amplification of α_2-globin gene by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to screen for mutations in stop codon of α_2-globin gene. Hemoglobin Constant Spring, one of the mutations found in stop codon of α_2-globin gene, were then discriminated from other mutations by a restriction site created semi-nested PCR. The semi-nested PCR product from Hb CS gene possessed a site for restriction enzyme Tth 111I, while the other mutations or normal sample did not; thus, semi-nested PCR product which could be cut by restriction enzyme Tth 111I was generated from Hb CS gene.

This method was employed to detect mutations in α_2-termination codon and Hb Constant Spring in northern Thailand populations. Of the 191 cord blood samples, 186 were found to possess normal α_2-termination codon and 5 samples were found to be heterozygotes of normal and abnormal α_2-termination codon. All these five abnormal α_2-termination samples were proved to be Hb Constant Spring gene. The prevalence of Hb Constant Spring gene from this study was 2.62% and the frequency of this gene was 0.013. An additional of 18 nondeletion Hb H disease patients was also studied. The study showed that all samples except one possessed Hb CS gene. The data suggested that Hb Constant Spring gene was the major cause in nondeletional Hb H disease patients in northern Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

This newly modified method for detecting Hb Constant Spring is simpler and reliable. Many samples can be detected within a short time. The method is useful for routine diagnosis and genetic counseling, in order to prevent or control this particular gene in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงในประชากรภาคเหนือของไทย การตรวจในระดับโมเลกุล โดยการเพิ่มจำนวนยีนที่ออกแบบให้มีจุดตัดของเอ็นไซม์จำเพาะ

ชื่อผู้เขียน นายวิโรจน์ ตันติเวชอภิกุล

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

ผศ.ดร.ลักษณา	มกรแก้วเกยูร	ประธานกรรมการ
ผศ.ดร.พรงาม	ลิ้มตระกูล	กรรมการ
ดร.วสันต์	จันทราทิตย์	กรรมการ
นพ.นพพร	สิทธิสมบัติ	กรรมการ

บทคัดย่อ

ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่ง ความผิดปกตินี้เกิดขึ้นจากรหัสหยุดของยีนแอลฟา2 โกลบินเปลี่ยนจาก TAA เป็น CAA เมื่อมีการแปลรหัสโปรตีนของไรโบโซมผ่านรหัสที่ผิดปกตินี้ จะไม่เกิดการหยุดตามปกติ แต่จะมีการแปรรหัสต่อไปจนพบรหัสหยุดใหม่ การที่มีการแปลรหัสเข้าไปสู่ปลายด้าน 3' นี้ ทำให้ได้สายเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอที่ไม่เสถียร และทำให้มีการลดการสร้างของสายแอลฟาโกลบิน ยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงนี้เมื่อไปร่วมกับความผิดปกติของธาลาสซีเมียชนิดแอลฟา จะทำให้เกิดภาวะโลหิตจางเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อร่วมกับการขาดหายไปของแอลฟาโกลบินยีน 2 ยีน ($--/\alpha^{cs}\alpha$) ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดโรคฮีโมโกลบินเอชที่พบได้มากในเมืองไทย ผู้ป่วยมักจะมีอาการรุนแรงกว่าผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิดที่เกิดจากการขาดหายไปของยีน 3 ยีน ($--/-\alpha$) โดยในผู้ป่วยบางคน มีอาการรุนแรงจนต้องมีการถ่ายเลือดเป็นครั้งคราว ดังนั้นการตรวจภาวะที่เป็นฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง จึงมีความสำคัญต่อการให้คำปรึกษาต่อคู่สมรสที่มีอัตราเสี่ยงต่อการให้บุตรที่เป็นโรคชนิดนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการศึกษาครั้งนี้ เราได้เสนอการตรวจหาฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง ในระดับโมเลกุลโดยใช้วิธีโพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน ทำการเพิ่มจำนวนของยีนแอลฟา2 หลังจากนั้น จึงนำเอาท่อนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วนั้น มาศึกษาความสามารถในการตัดด้วยเอ็นไซม์ Mse I ในยีนปกติท่อนดีเอ็นเอสามารถถูกตัดได้ ในขณะที่ยีนที่มีความผิดปกติบนรหัสหยุดนี้ จะไม่สามารถถูกตัดได้ เนื่องจากความผิดปกติบนรหัสหยุดนี้ได้มีถึง 4 แบบด้วยกัน การที่จะตรวจว่าเป็นชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงหรือไม่นั้น สามารถทำได้โดยนำเอาผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนท่อนดีเอ็นเอในครั้งแรก มาเป็นต้นแบบสำหรับสร้างท่อนดีเอ็นเอ ที่ออกแบบให้สร้างจุดตัดสำหรับยีนที่เป็นฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงโดยเฉพาะ โดยวิธีนี้ ท่อนดีเอ็นเอใหม่ที่มีฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงยีน จะสามารถถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ Tth 111 I.

วิธีดังกล่าวได้นำมาใช้ศึกษาการแพร่ระบาดของยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง ในประชากรภาคเหนือ จากการสุ่มตัวอย่างในเด็กทารกแรกคลอดจำนวน 191 ราย พบว่า มีตัวอย่าง 5 ราย ที่เป็นเฮทเทอโรซัยโกทของยีนชนิดนี้ เมื่อคิดเป็นร้อยละของตัวอย่างทั้งหมด พบว่าอุบัติการการแพร่ระบาดของยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง คิดเป็นร้อยละ 2.62 % โดยมีความถี่ของยีนคิดเป็น 0.013 นอกจากนั้นแล้ว ยังได้ทำการตรวจหาฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชชนิดที่ไม่เกิดจากการขาดหายของยีน (--/$\alpha^T\alpha$) จำนวน 18 ราย พบว่ามีความผิดปกติชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงร่วมด้วยถึง 17 ราย

วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีความน่าเชื่อถือและสะดวกรวดเร็ว สามารถตรวจสอบความผิดปกติชนิดฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงได้มากรายภายในเวลาอันสั้น อันจะเป็นประโยชน์ในการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม สำหรับควบคุมและป้องกันโรคอันเกิดจากความผิดปกติชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved