



การตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR

มัตติกา มัตตูกัง^a และ สายศิริ มีระเสน^{b*}

Diagnosis of alpha thalassemia using 4-deletion multiplex PCR

Muttika Muttookung^a and Saisiri Mirasena^{b*}

^aสถาบันชีววิทยาโมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

^cภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

^bInstitute of Molecular Bio Sciences, Mahidol University, Bangkok

^bBiochemistry Department, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok

*Corresponding Author. E-mail address: saisiri_m@hotmail.com

Received 30 May 2011; accepted 31 August 2011

บทคัดย่อ

แอลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบบ่อยในประเทศไทย ชนิดที่มีความรุนแรง คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเกิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (SEA) และ Thai deletion นอกจากนี้ยังมีแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ซึ่งความรุนแรงของโรคไม่มากเท่าชนิดแรกเกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด -3.7 kb และ -4.2 kb ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคแอลฟาธาลัสซีเมียของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรด้วยเทคนิค gap PCR นั้นเป็นการตรวจเฉพาะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเกิดจากการขาดหายไปของยีนชนิด SEA และ THAI deletion เท่านั้น หากผู้ที่มารับการตรวจมียีนของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดอื่นอาจนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยที่ผิดพลาดได้ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคที่สามารถตรวจหาพันธุกรรมแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายไปของยีนทั้ง 4 ชนิดในการตรวจเพียงครั้งเดียว (4-deletion multiplex PCR) ได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α -thal 1) ชนิด SEA, THAI deletion แอลฟาธาลัสซีเมีย (α -thal 2) ชนิด -3.7 kb และ -4.2 kb deletion ซึ่งครอบคลุมชนิดของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินที่พบได้ในประชากรจังหวัดพิษณุโลก โดยได้นำมาตรวจวินิจฉัยผู้ที่มารับการตรวจโรคธาลัสซีเมียจำนวน 10 ราย พบว่า เทคนิค 4-deletion multiplex PCR ให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องเหมือนกับที่ใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคแบบเดิม แต่สามารถลดค่าใช้จ่าย และระยะเวลาในการตรวจหาชนิดของโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายไปของยีนได้ โดยคณะผู้วิจัยมีแผนที่จะนำเทคนิคดังกล่าวมาตรวจวินิจฉัยในประชากรพิษณุโลกในจำนวนอีก 100 ราย เพื่อประเมินและทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค รวมทั้งเก็บข้อมูลความชุกของชนิดแอลฟาธาลัสซีเมียในพื้นที่ดังกล่าว เพื่อใช้ในการวางแผนการควบคุมป้องกันโรคแอลฟาธาลัสซีเมียในจังหวัดพิษณุโลกต่อไป

คำสำคัญ: การตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมีย 4-deletion multiplex PCR

Abstract

α -Thalassemia is the common genetic disease in Thailand. The cause of α -thalassemia is the deletion of α -globin gene. Southeast Asian (SEA) and THAI deletion types caused the most severe α -thalassemia 1 and deletion sizes 3.7 kb and 4.2 kb caused α -thalassemia 2. For α -thalassemia diagnosis at Naresuan University Hospital, gap PCR technique was used to detect only α -thalassemia 1, SEA and THAI deletion. This protocol did not cover α -thalassemia 2 that might cause misdiagnosis. We developed the technique to detect 4 α -globin gene deletions (α -thalassemia 1: SEA, THAI types and α -thalassemia 2: -3.7 kb, α -4.2 kb) found in Phitsanulok population so called 4-deletion multiplex PCR. We tested this technique in known 10 samples from Naresuan University and found that it concordant to the conventional technique. This technique is accurate, efficient, less time-consuming and save the cost in α -thalassemia diagnosis. We planned to tested and evaluated deletions types in 100 Phitsanulok samples. Moreover, these data could be valuable for prevention plan and control of α -thalassemia disease in Phitsanulok province.

Keywords: α -thalassemia diagnosis, 4-deletion multiplex PCR

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบบ่อยในประเทศไทย เกิดจากการสังเคราะห์สายโกลบินที่ผิดปกติโดยยีนแอลฟาโกลบินและยีนบีตาโกลบินทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โกลบิน หากเกิดความผิดปกติบนยีนแอลฟาโกลบิน เรียกว่า แอลฟาธาลัสซีเมีย ซึ่งมี 2 ชนิดคือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α -thal 1) และ แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α -thal 2) เกิดจากการขาดหายไปของแอลฟาโกลบินยีนชนิด Southeast Asian (SEA) และ THAI deletions แอลฟาธาลัสซีเมีย

เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบบ่อยในประเทศไทยชนิดที่มีความรุนแรง คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเกิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (SEA) และ THAI deletions นอกจากนี้ยังมีแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ซึ่งความรุนแรงของโรคไม่มากเท่าชนิดแรกเกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด -3.7 kb และ -4.2 kb ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคแอลฟาธาลัสซีเมียของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรด้วยเทคนิค gap PCR นั้นเป็นการตรวจเฉพาะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเกิดจากการขาดหายไปของยีนชนิด SEA และ THAI deletion เท่านั้น

หากผู้ที่มารับการตรวจมียืนของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดอื่น อาจนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยที่ผิดพลาดได้ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคที่สามารถตรวจหายืนแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายของยืนทั้ง 4 ชนิดในการตรวจเพียงครั้งเดียว (4-deletion multiplex PCR) ได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α -thal 1) ชนิด SEA, THAI deletion แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α -thal 2) ชนิด -3.7 kb และ -4.2 kb deletion ซึ่งครอบคลุมชนิดของการขาดหายไปของยืนแอลฟาโกลบินที่พบได้ในประชากรไทย โดยได้นำมาตรวจวินิจฉัยผู้ที่มารับการตรวจโรคธาลัสซีเมียจำนวน 10 ราย พบว่า เทคนิค 4-deletion multiplex PCR ให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องเหมือนกับการใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคแบบเดิม แต่สามารถลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการตรวจหาชนิดของโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายของยืนได้ จึงสามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และ 2 ที่พบมากในประชากรในจังหวัดพิษณุโลก

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การพัฒนาเทคนิค 4-deletion multiplex PCR เริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของ deletion ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α -thal 1) ชนิด SEA, THAI deletions และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α -thal 2) ชนิด -3.7 kb, -4.2 kb deletions ด้วยดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของ deletion (positive control) จากโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยมหิดล และประเมินประสิทธิภาพโดยการนำเทคนิคนี้มาตรวจวินิจฉัยในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของ deletion จำนวน 10 รายจากหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยนเรศวร

1. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดที่ได้จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย

นเรศวร มาสกัดดีเอ็นเอด้วย Chelex® method โดยเติม lysis buffer 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างเลือด 30 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งแล้วดูดสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย 5% Chelex® ให้ท่วมตะกอน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เพื่อใช้หาสภาวะที่เหมาะสมและการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคนี้

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของ 4-deletion multiplex PCR

เตรียมสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการทำ 4-deletion multiplex PCR ดังนี้ 200 μ M dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.25 U Taq DNA Polymerase (QIAGEN, Germany), Q-solution, 200–500 μ g DNA และ α -thalassemia primers สำหรับการตรวจ deletion ทั้ง 4 ชนิดจำนวน 9 เส้น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นที่ใช้ตั้งแสดงในตารางที่ 1 รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งที่ไพรเมอร์ทั้ง 9 เส้นวางบริเวณยืนแอลฟาโกลบิน จากนั้นนำไปตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค gap PCR โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ Taq DNA Polymerase อยู่ในสภาพพร้อมทำหน้าที่ จากนั้นจึงเข้าสู่วงจรของการทำ gap PCR โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 15 วินาที จำนวน 35 รอบ และเพิ่ม extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำมาตรวจวินิจฉัยด้วย 1.5% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 9 เส้น ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียทั้ง 4 ชนิด (ปรับปรุงจาก Tan et al., 2001)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ตำแหน่ง	ความเข้มข้น
α 2/3.7	CCC CTC GCC AAG TCC ACC C	HUMHBA4:5676→5694	5 pmol
3.7-R	AAA GCA CTC TAG GGT CCA GCG	HUMHBA4:11514→11494	5 pmol
α 2-R	AGA CCA GGA AGG GCC GGT G	HUMHBA4:7475→7457	5 pmol
4.2-F	GGT TTA CCC ATG TGG TGC CTC	HUMHBA4:3064→3084	12.5 pmol
4.2-R	CCC GTT GGA TCT TCT CAT CAT TTC CC	HUMHBA4:8942→8920	12.5 pmol
SEA-F	CGA TCT GGG CTC TGT GTT CTC	HSGG1:26120→26140	5 pmol
SEA-R	AGC CCA CGT TGT GTT CAT GGC	HSCOS12:3817→3797	5 pmol
THAI-F	GAC CAT TCC TCA GCG TGG GTG	HSGG1:9592→9612	7.5 pmol
THAI-R	CAA GTG GGC TGA GCC CTT GAG	HSCOS12:1241→1221	7.5 pmol

อภิปรายผลการศึกษา

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค 4-deletion multiplex PCR นี้พบว่าจำเป็นต้องใส่สาร adjuvant เช่น DMSO, betaine ซึ่งในที่นี้คือ Q-solution (QIAGEN, Germany) ร่วมด้วยเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยแอลฟาโกลบินยีนเป็น GC-rich จึงต้องใช้ adjuvant ในสภาวะดังกล่าว

นอกจากนี้ในการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียในผู้ที่มารับการตรวจที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร พบว่าให้ผลตรงกับผลการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี gap PCR ของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร พบว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion เป็นชนิดที่พบมากที่สุด (0.4%) รองลงมาคือ THAI deletion (0.2%) และไม่พบแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิด 3.7 kb และ 4.2 kb deletions ในตัวอย่างจำนวน 10 ราย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wong et al., 2004 ที่จะพบเฉพาะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในประชากรพิษณุโลก แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจวินิจฉัยมีจำนวนน้อยเกินไป จึงต้องดำเนินการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR เพิ่มเติมจึงจะสามารถสรุปผลได้สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ตรวจในเขตพื้นที่อื่น ๆ ในประเทศไทยได้ เพราะสามารถตรวจได้ทั้งแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 เนื่องจากการอพยพย้ายถิ่นของประชากรไทยและชาวต่างชาติในประเทศไทย ทำให้การตรวจวินิจฉัยที่ครอบคลุมแอลฟาธาลัสซีเมียทั้ง 2 ชนิด จะสามารถควบคุมและป้องกันการเกิดโรคของประชากรในจังหวัดพิษณุโลกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการศึกษา

เทคนิคการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากการตรวจที่ครอบคลุมการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และ 2 ซึ่งเป็นชนิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน ทั้ง 4 ชนิด คือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α -thal 1) ชนิด SEA และ THAI deletions แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 α -thal 2) ชนิดที่มีการขาดหายของยีนแอลฟาขนาด -3.7 kb และ -4.2 kb ที่พบมากในประชากรไทย สามารถนำไปใช้ได้ในทุกพื้นที่ของประเทศไทยและประเทศข้างเคียงบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณ ดร.หม่อมหลวง เสาวรส สวัสดิ์วัฒน หัสนาโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย

มหิดล ที่เอื้อเพื่อไพรเมอร์และดีเอ็นเอที่ใช้ในการพัฒนาเทคนิคและทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ขอขอบคุณหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bhat, V., Dewan, K.K., & Krishnaswamy, P.R. (2010). The diagnosis of α -thalassemia: A case of hemoglobin H - $\alpha^{3.7}$ deletion. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24, 435-440.
- Chong, S.S., Boekm, C.D., Cutting, G. R. & Higgs, D.R. (2000). Simplified multiplex-PCR diagnosis of common Southeast Asian deletional determinants of α -thalassemia. *Clinical Chemistry*, 46, 1692-1695.
- Chong, S.S., Boehm, C.D., Higgs, D.R. & Cutting, G.R. (2000). Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood*, 95, 360-62.
- Eng, B., Patterson, M., Borys, S., Chui, D.H.K. & Wayne, J.S. (2000). PCR-based diagnosis of the Filipino (--Fil) and thai (--THAI) α -thalassemia-1 deletions. *American Journal of Hematology*, 63, 54-56.
- Ko, T.M., Tseng, L.H., Kao, C.H., Lin, Y.W., Hwa, H.L., Hsu, P.M., et al. (1998). Molecular characterization and PCR diagnosis of Thailand deletion of α -globin gene cluster. *American Journal of Hematology*, 57, 124-130.
- Liu, Y.T., Old, J.M., Miles, K., Fischer, C.A., Weatherall, D.J. & Clegg, J.B. (2000). Rapid detection of alpha thalassemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reaction. *British Journal of Haematology*, 108, 295-99.
- Wong, P., Thanomrat, P., Srithipayawan, S., Jermnim, N., Niyomthom, S., Nimmuch, N., et al. (2006). Risk of a couple having a child with severe thalassemia syndrome; prevalence in lower northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medical Public Health*, 37, 1-4.

Pornprasert, S., Phusua, A., Suanta, S., Sawtung, R. & Sanguansermisri, T. (2008). Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR green1 and high resolution melting analysis. *European Journal of Hematology*, 80, 510-514.

Prathomtanapong, P., Pornprasert, S., Phusua, A., Suanta, S., Saetung, R. & Sanguansermisri, T. (2008). Detection and identification of β -thalassemia 3.5 kb deletion by SYBR green 1 and high resolution melting analysis. *European Journal of Hematology*, 82, 159-160.

Pravatmuang, P., Tiloklurs, M., Suannum, M. & Chaipat, C. (1995). Phitsanulok population: the highest incidence of hemoglobin E in the northern provinces of Thailand and PND counseling. *Southeast Asian Journal of Tropical Medical Public Health*, 26 suppl 1, 266-70.

Shaji, R.V., Eunice, S.E., baidya, S., Srivastava, A. & Chandy, M. (2003). Determination of the breakpoint and molecular diagnosis of a common α -thalassemia-1 deletion in the Indian population. *British Journal of Hematology*, 123, 942-947.

Tan, A.C., Quah, T.C., Low, P.S. & Chong, S.C. (2000). A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α -thalassemia. *Blood*, 98, 250-251.

Wong, P., Thanomrat, P., Srithipayawan, S., Taytiwat, P., Jermnim, N., Niyomthom, S., et al. (2004). Prevalence of thalassemia trait from screening program in pregnant women of Phitsanulok. *Thai Journal Hematology Transfusion Medicine*, 14, 181-86.