

Thesis Title : Deletion of Alpha Globin Gene and the Severity
of Homozygous Beta Thalassemia

Author : Miss Suwanna Buaseangchan

Master of Science : Biochemistry

Examining Committee:

Associate Professor Dr.Torpong Sanguansermisri.....Chairman

Assistant Professor Dr.Vichai WongchaiMember

Assistant Professor Luksana MakonkawkeyoonMember

ABSTRACT

Homozygous β -thalassemia is an inherited disorder characterized by a reduction or absence of β -globin production. The clinical manifestations of the disease are extremely heterogeneous. Symptoms range from a severe disorder which requires regular blood transfusion for survival (thalassemia major) to a less severe disorder with milder non-transfusion dependent symptoms (thalassemia intermedia). It has been found that the coinheritance of α -thalassemia can ameliorate the clinical severity of homozygous β -thalassemia because of the reduction of imbalanced globin chain synthesis. In the present study, the DNA hybridization technique has been used to analyse the α -globin gene deletion in subjects with homozygous β -thalassemia, and the hematologic and clinical findings have been correlated with the α -globin genotype.

Recombinant plasmids, pEMBL α_2 and pEMBL β , were isolated

from the transformed E.Coli LK 111 by alkali lysis and purified by Sephacryl S-1000 gel filtration chromatography. The purified plasmids were digested with restriction enzymes PstI and Hind III yielding fragments of α_2 , β -specific fragments and pEMBL vectors. After separation of the fragments on low melting agarose gel, the two fragments were obtained by phenol extraction.

DNA was obtained from the venous blood of 20 subjects with thalassemia major and 16 subjects with thalassemia intermedia by phenol-chloroform extraction. DNA was digested with restriction enzyme EcoRI. Fragments of DNA were separated by gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane by the Southern blotting technique. The blotted membrane was hybridized with the 32 P-labelled α_2 - and β -specific probes. DNA mapping by EcoRI enzyme can detect all α -thalassemia with α -globin gene deletion that are α -thalassemia 1 and α -thalassemia 2. Types of α -thalassemia 2 were further investigated by digestion of the DNA with Bgl II enzyme and hybridized to α_2 - specific probe.

Distribution of α -globin genotype in subjects is as below :

24 cases had normal α -globin gene ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) ; 8 cases had α -thalassemia 2 in which 7 cases had heterozygous state ($-\alpha/\alpha\alpha$) and 1 case had homozygous state ($-\alpha/-\alpha$); and 4 cases had α -thalassemia 1 ($-_ / \alpha\alpha$). Hematologic and clinical findings of subjects were statistically compared according to the α -globin genotype. There were no significant differences in two groups of subjects with either one or two α -globin gene deletion and a group of subjects with normal

α -globin gene. However, both groups of subjects with deleted α -globin genes had higher HbA₂ levels than a group of subjects with normal α -globin gene and the subjects with two α -globin gene deletion had later disease onset.

There was no significant difference in the incidence of α -thalassemia between the two groups of subjects with thalassemia major (30%) and thalassemia intermedia (37.5%). Thus in the group studied the coinheritance of α -thalassemia did not show the ameliorative effect on the severity of homozygous β -thalassemia.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ : การขาดหายของยีนอัลฟา โกลบิน กับความรุนแรงของโรค
ไฮโมซัยกัสมเบตาธาลัสซีเมีย

ชื่อผู้แต่ง : นางสาวสุวรรณา บัวแสงจันทร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต : สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ. นพ. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี ประธานกรรมการ

ผศ. ดร. วิชัย วงศ์ไชย กรรมการ

ผศ. ลักษณ์า มกรแก้วเกยูร กรรมการ

บทคัดย่อ

ไฮโมซัยกัสมเบตาธาลัสซีเมีย เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีการสร้างสายเบตา โกลบินลดลง หรือ ไม่มีการสร้างเลย ทำให้สูญเสียสมดุลระหว่างสายอัลฟาและเบตา โกลบิน ผู้ป่วย จะมีการสร้างฮีโมโกลบิน ได้น้อยลง และมีภาวะโลหิตจาง พบว่าผู้ป่วย ไฮโมซัยกัสมเบตาธาลัสซีเมีย มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันมาก ผู้ป่วยบางรายมีอาการหนัก และต้องรับการเติมเลือดอย่างสม่ำเสมอ (ธาลัสซีเมีย เมเจอร์) ในขณะที่ผู้ป่วยบางรายมีอาการค่อนข้างดี และไม่ต้องรับการเติมเลือด (ธาลัสซีเมีย อินเทอร์มีเดีย) เป็นที่น่าสนใจว่า หากผู้ป่วย ไฮโมซัยกัสมเบตาธาลัสซีเมีย ได้รับผลร่วมจากยีนอัลฟาธาลัสซีเมีย ซึ่งทำให้มีการสร้างสายอัลฟา โกลบินลดลงด้วย ผู้ป่วยน่าจะมี ความรุนแรงของโรคลดลง การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาผลร่วมของภาวะอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการ ขาดหายของยีน โดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอ ไฮบริโดเซชันต่อลักษณะทางโลหิตวิทยา และลักษณะทาง คลินิกของผู้ป่วย ไฮโมซัยกัสมเบตาธาลัสซีเมีย

การศึกษาทำโดยแยกพลาสมิด pEMBL α_2 และ pEMBL β จากแบคทีเรีย E. coli LK 111 และทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี เจลฟิลเทรชัน โครมาโตกราฟี จากนั้นตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอชนิด อัลฟาสองและซีตาออกจากพลาสมิดเวคเตอร์ โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิด นีเอสทีแอนด์อินดีทรี สกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งสองชนิดด้วยสารฟีนอล เพื่อนำไปใช้เป็นท่อนดีเอ็นเอตรวจสอบต่อไป

ทำการแยกดีเอ็นเอจากเลือดผู้ป่วย 36 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยชาลส์ซีเมียเมเจอร์ 20 ราย และผู้ป่วยชาลส์ซีเมียอินเทอร์มีเดีย 16 ราย ด้วยสารฟีนอล และคลอโรฟอร์ม จากนั้นตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดอโคอาร์วิน แยกก่อนดีเอ็นเอที่ถูกตัดในสนามไฟฟ้า แล้วขับไปบนแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลส โดยวิธี Southern blot ก่อนดีเอ็นเอบนแผ่นกรองไนโตรเซลลูโลสจะจับกับก่อนดีเอ็นเอที่ตรวจสอบที่ติดฉลากด้วยสารรังสีฟอสฟอรัสในขบวนการไฮบริดเซชัน และให้ผลการตรวจสอบเป็นแถบดำบนแผ่นฟิล์ม อี็กซ์เรย์ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีความผิดปกติชนิดอัลฟาชาลส์ซีเมียสอง จะถูกนำมาศึกษาลักษณะของความผิดปกติ โดยตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะบีจีแอลทู แล้วไฮบริดซ์กับก่อนดีเอ็นเอที่ตรวจสอบชนิดอัลฟาสอง

ผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วย 24 ราย ไม่มีความผิดปกติของยีนอัลฟาไกลบิน ($000/000$) ผู้ป่วย 8 ราย แสดงความผิดปกติของยีนชนิดอัลฟาชาลส์ซีเมียสอง ในจำนวนนี้ 7 ราย เป็นเฮเทอโรซัยโกท ($00/000$) และ 1 ราย เป็นโฮโมซัยโกท ($00/00$) ผู้ป่วยอีก 4 ราย แสดงความผิดปกติของยีนชนิดอัลฟาชาลส์ซีเมียหนึ่ง ($00/000$) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะอัลฟาชาลส์ซีเมียตามลักษณะความผิดปกติของยีน กับลักษณะทางโลหิตวิทยาและลักษณะทางคลินิก พบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มที่มีการขาดหายของยีนอัลฟาไกลบินหนึ่งยีนและสองยีนมีลักษณะทางโลหิตวิทยาและลักษณะทางคลินิก ไม่แตกต่างจากผู้ป่วยที่มียีนอัลฟาไกลบินปกติ แม้ว่าผู้ป่วยที่มีการขาดหายของยีนอัลฟาไกลบินทั้งสองกลุ่มจะมีระดับฮีโมโกลบินเอสอง สูงกว่าผู้ป่วยที่มียีนอัลฟาไกลบินปกติ และผู้ป่วยที่มีการขาดหายของยีนอัลฟาไกลบินสองยีนจะปรากฏอาการทางคลินิกซ้ำกว่าผู้ป่วยที่มียีนอัลฟาไกลบินปกติก็ตาม

การศึกษานิติการของภาวะอัลฟาชาลส์ซีเมีย ในผู้ป่วยชาลส์ซีเมียเมเจอร์ และชาลส์ซีเมียอินเทอร์มีเดีย พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะพบยีนอัลฟาชาลส์ซีเมีย ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มเป็น 30 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งนับว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ภาวะอัลฟาชาลส์ซีเมียชนิดที่มีการขาดหายของยีน ไม่ได้แสดงผลลดความรุนแรงของโรคโฮโมซัยกัสเบตาชาลส์ซีเมีย ในกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการศึกษา