THESIS TITLE Characterization of molecular defects in hemoglobin H patients by non-radioactive Southern hybridization

AUTHOR Miss Roongsiri Muangmoonchai

M.Sc. in Biochemistry

EXAMINED COMMITTEE :

Assist. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Panja Kulapong	Member
Assist. Prof. Dr. Porn-ngam Limtrakul	Member
Assist. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member

ABSTRACT

Hemoglobin H disease is the most severe of the α-thalassemia phenotypes compatible with life. This syndrome has been observed at high frequency in Thailand. The molecular basis is heterogeneous accounting for variability in the severity of the clinical disorder. Some patients may go through life with little disability, while in others the disorder may be as crippling as homozygous β thalassemia. Hemoglobin H disease is most often due

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

to deletion of three of the four α globin genes (genotype --/-α). However, it can also result from the coinheritance of deletion and nondeletion defects (-- / $\alpha\alpha^T$) or homozygosity of nondeletion defects ($\alpha\alpha^T$ / $\alpha\alpha^T$). In this study, we are interested in identifying the molecular basis of Hb H disease in Northern Thailand where there is high incident.

Although Southern hybridization carried out with ^{32}P radioactively - labeled probe is sensitive, it also has several disadvantages so the non-radioactive Southern hybridization, PhotoGene^{TM}Detection System was employed here. DNA fragments generated by *Eco* R I and *Bgl* II restriction endonuclease digestion were separated through an agarose gel electrophoresis and transferred to nylon membrane by Southern blotting. The filter-bound DNA fragments were hybridized to biotin - labeled α- or ζ - probe. Streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (SA-AP) is bound to the biotin groups, followed by washing under stringent condition. The membrane is incubated with a substrate for alkaline phosphatase that luminesces when dephosphorylated and autoradiography.

Among 28 patients with Hb H disease, 18 cases possessed --/ $\alpha^T\alpha$, 7 cases possessed --/-$\alpha^{3.7}$, 3 cases possessed --/-$\alpha^{4.2}$ genotype were observed which accounting for 64%, 25%, 11%, respectively. The result indicated that the majority of Hb H disease in Northern Thailand is in the form of deletion and nondeletion type.(--/$\alpha^T\alpha$). This data will be useful for the clinician to predict the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

severity of Hb H patients, allow prenatal diagnosis in some cases and also lead to genetic counselling and prevention in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาความบกพร่องระดับโมเลกุลในผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอชโดยวิธีเซาเทิร์นไฮบริไดเซชั่นแบบไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี

ผู้เขียน นางสาวรุ้งสิริ เมืองมูลชัย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

ผศ.ดร. ลักษณา มกรแก้วเกยูร	ประธานกรรมการ
รศ.นพ. ปัญจะ กุลพงษ์	กรรมการ
ผศ.ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	กรรมการ
ผศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคฮีโมโกลบินเอชเป็น α-thalassemia ชนิดที่มีความรุนแรงที่สุดที่ยังมีชีวิตอยู่ โรคนี้พบเป็นจำนวนมากในประเทศไทย ความบกพร่องระดับโมเลกุลของโรคมีความหลากหลายเนื่องจากมีอาการทางคลินิกที่รุนแรงมากน้อยแตกต่างกัน ผู้ป่วยบางรายดำเนินชีวิตได้โดยมีความผิดปกติเพียงเล็กน้อยใน ขณะที่บางรายอาจมีความรุนแรงคล้ายเป็น homozygous β thalassemia ส่วนใหญ่โรคฮีโมโกลบินเอชเกิดจากการที่ยีนอัลฟาโกลบินขาดหายไป 3 ยีนในจำนวนทั้งหมด 4 ยีน(จีโนไทป์ - -/-α) อย่างไรก็ตาม โรคนี้ยังอาจเกิดจากความผิดปกติร่วมกันระหว่างยีนที่ขาดหายกับความบกพร่องชนิดที่ไม่มีการขาดหายของยีน - - / $\alpha\alpha^T$ หรือเกิดจากโฮโมไซโกตของความบกพร่องชนิดที่ไม่มีการขาดหายของยีน $\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T$ การทำวิจัยครั้งนี้มีความสนใจที่จะวิเคราะห์ความบกพร่องระดับโมเลกุลของโรคฮีโมโกลบินเอชทางภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งพบอุบัติการของโรคสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถึงแม้ว่า วิธีเซาเทิร์นไฮบริไดเซชันแบบใช้สารกัมมันตภาพรังสี คือ ^{32}ฟอสฟอรัส ติดสลากตัวตาม จะเป็นวิธีที่มีความไวแต่นับเป็นวิธีที่มีข้อด้อยหลายประการ ดังนั้นจึงนำวิธีเซาเทิร์นไฮบริไดเซชันแบบไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี คือ PhotoGene^{TM} Detection System มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ท่อนดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* R I และ *Bgl* II นำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วถ่ายซับลง บนแผ่นไนลอนโดยวิธี Southern blotting ดีเอ็นเอที่จับอยู่บนแผ่นไนลอนจะไฮบริไดซ์กับตัวตรวจตามชนิดซีตาและอัลฟาที่ติดสลากด้วยไบโอติน สเตรปอะวิดินที่คอนจูเกตกับเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทสจะไปจับกับหมู่ไบโอติน จากนั้นล้างสารส่วนเกินออกภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เมื่อเติมสับสเตรทของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส จะเกิดการเรืองแสงเมื่อถูกเอาหมู่ฟอสเฟตออก และให้ผลการตรวจสอบเป็นแถบดำบนฟิล์มเอกซเรย์

ในจำนวนผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช 28 ราย พบว่า 18 ราย มีจีโนไทป์แบบ - -/$\alpha^T\alpha$, 7 ราย เป็น แบบ - -/ -$\alpha^{3.7}$ และ 3 รายเป็นแบบ - -/ -$\alpha^{4.2}$ คิดเป็น 64%, 25% และ 11% ตามลำดับ จะเห็นว่าโรคฮีโมโกลบินเอชทางภาคเหนือของประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นความบกพร่องชนิดที่มีการขาดหายของยีนร่วมกับชนิดที่ไม่มีการขาดหายของยีน (- -/ $\alpha^T\alpha$) จากผลการทดลองนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ที่จะเข้าใจความรุนแรงของโรค, วินิจฉัยก่อนคลอดในบางราย และนำไปสู่การให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมและการป้องกันในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved