Thesis Title Detection of Molecular Mutation in β-thalassemia Majors by Direct β-globin Gene Sequencing

Author Mr. Channarong Primsorn

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory committee

Assist. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai Chairman

Emeritus Prof. Torpong Sanguansermsri Member

Abstract

β-thalassemia is one of the most common forms of thalassemia in Thailand, including at least 25 different molecular defects identified to date, and with the possibility of more mutation being found. The methods for the detection of β-thalassemia mutations employed in previous studies in Thailand, such as dot-blot analysis, reverse dot-blot, allele specific polymerase chain reaction (ASPCR), amplification refractory mutation system (ARMS), and restriction enzyme digestion, were unsatisfactory because they detected only a limited set of mutations, namely those labeled on the blot. This leaves a variable part of the β-thalassemia mutations undetermined.

The major gold of this study was to characterize the molecular basis of a β-thalasemic genes in β-thalassemia major patients in northern Thailand by using automated fluorescence-based DNA sequencing method using an ABI

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

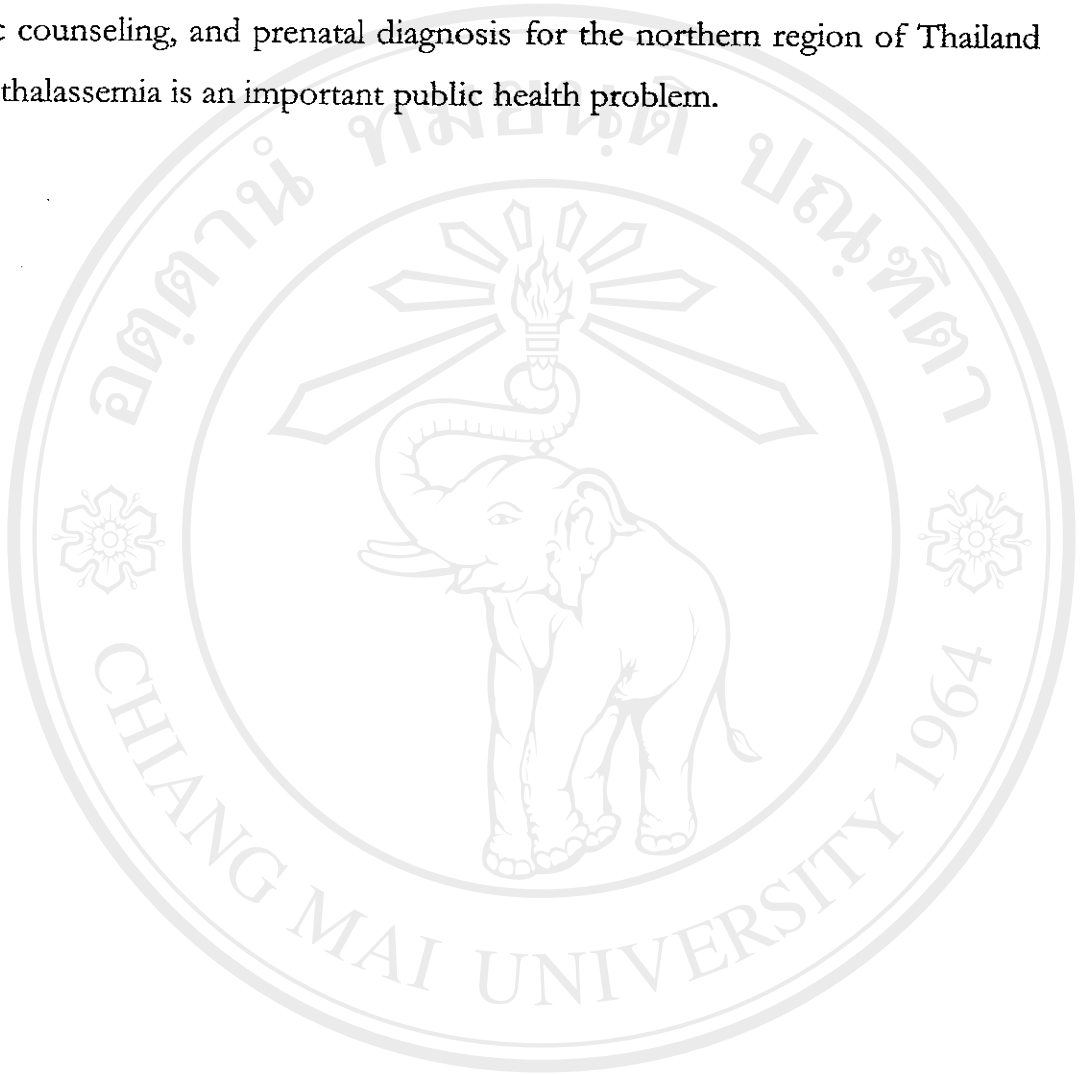
Prism® 310 sequencer. In this work, a 781 bp fragment (exonI-II) and a 660 bp fragment (exon III) of β-globin gene were amplified using 2 sets of primers which designed to cover all mutations reported in Thailand. For sequencing 5′ region or the 3′ region of the amplicons, specific primers were used to determine the defects. In addition, a new β-thalassemia mutation was subsequently confirmed and detected single nucleotide polymorphism (SNP) at codon 2 nt 3 by cloning the amplicon fragment followed by DNA sequencing of the individual β-globin gene.

A total of 13 different mutations have been found in 272 thalassemic alleles. The four most common β-thalassemic genes were codons 41/42 (-TCTT), codon 17 (A->T), IVS I nt 1 (G->T), and codons 71/72 (+A). These accounted for 94.47% in 257 alleles from 134 patients. The other nine rare mutations accounted for 5.53% of the alleles studied. Two new mutations which have not been reported in Thailand before were detected, initiation codon nt 2 (T-G), and codon 55 (-A), both defects resulted in β^0-thalassemia phenotype. The same result was obtained when the codon 55 (-A) mutation was analyzed using molecular cloning followed by sequencing technique. Furthermore, these mutation, initiation codon nt 2 (T-G), and codon 55 (-A), which are associated with the T and C at the third position in codon 2, respectively.

Therefore, Automated fluorescence-based DNA sequencing of amplified portions of the β-globin gene is rapid and reliable method for detection of point mutations and small deletions or insertion in both heterozygous and homozygous states. However, the sequencing procedure can not be able to detect large deletions encompassing the entire β-globin (and δ-globin) gene, mutations that were reported in single families from northern and northeastern Thailand. Prenatal diagnosis of such cases is possible by quantitative HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

analysis of Hb fractions in cord blood samples. These results will serve as an initial database for DNA-bases planning and preventive program of thalassemia and facilitate the improvement of medical services such as carrier screening, genetic counseling, and prenatal diagnosis for the northern region of Thailand where thalassemia is an important public health problem.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจหาการกลายพันธุ์ระดับโมเลกุลในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียเมเจอร์โดยวิธีเบต้าโกลบินยีนซีเควนซิง

ผู้เขียน นายชาญณรงค์ พิมพ์ศร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย ประธานกรรมการ

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นพ. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี กรรมการ

บทคัดย่อ

เบต้าธาลัสซีเมียเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดหนึ่งที่พบมากในประเทศไทยมีสาเหตุมาจากความผิดปกติระดับโมเลกุลบนเบต้าโกลบินยีน ปัจจุบันพบความผิดปกติที่ก่อให้เกิดโรคประมาณ 25 ชนิดในประเทศไทย วิธีการที่ใช้ตรวจหาความผิดปกติระดับโมเลกุลของเบต้าโกลบินยีนที่เคยรายงานมาก่อนในประเทศไทยเช่น dot-blot analysis, reverse dot-blot, allele specific polymerase chain reaction (ASPCR), amplification refractory mutation system (ARMS) และ restriction enzyme digestion เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาได้เฉพาะความผิดปกติที่เคยมีรายงานไว้ก่อนแล้ว (known mutation) เท่านั้น ซึ่งเป็นข้อจำกัด ไม่สามารถใช้วิธีเหล่านี้ตรวจหาความผิดปกติชนิดใหม่และไม่สามารถกำหนดรูปแบบของความผิดปกติแต่ละชนิด

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจหาความผิดปกติระดับโมเลกุลในผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเบต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทยโดยวิธี fluorescence base DNA sequencing และแสดงวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาชนิดความผิดปกติระดับโมเลกุลของโรคเบต้าธาลัสซีเมีย เริ่มจากเพิ่มปริมาณเบต้าโกลบินยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน เอ็กซอน I-II (ขนาด 781 คู่เบส) และ เอ็กซอน III (ขนาด 660 คู่เบส) ซึ่งไพร์เมอร์ดังกล่าวได้ออกแบบให้ครอบคลุมชนิดความผิดปกติที่เคยมีรายงานไว้ในประเทศไทยได้ทั้งหมด จากนั้นนำชิ้นส่วนของเบต้าโกลบินยีนที่เพิ่มปริมาณแล้วไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจหาลำดับเบสที่ผิดปกติโดยใช้เครื่องอ่านลำดับเบสแบบอัตโนมัติโดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อการอ่านลำดับเบสทางด้าน 5′ และ 3′ สำหรับความผิดปกติชนิดใหม่ที่พบจะนำมาทำโคลนนิ่งแล้วอ่านลำดับเบสเพื่อยืนยันความผิดปกติและตรวจหาตำแหน่งซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลิมอฟิส์มตำแหน่งที่ 3 ของโคดอนที่ 2

จากการศึกษายีนธาลัสซีเมียจำนวน 272 อัลลีลสามารถตรวจพบความผิดปกติทั้งหมด 13 ชนิดและจำแนกได้เป็นความผิดปกติที่พบบ่อยจำนวน 4 ชนิดคือ โคดอน 41/42 (-TCTT) โคดอน 17 (A->T) IVS I nt 1 (G->T) และ โคดอน 71/72 (+A) ซึ่งมีจำนวน 257 อัลลีลและคิดเป็นร้อยละ 94.47 ของจำนวนอัลลีลทั้งหมดที่ทำการศึกษา ส่วนความผิดปกติที่พบได้น้อยอีก 9 ชนิดมีจำนวนทั้งหมด 15 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 5.54 ของอัลลีลที่ทำการศึกษา และตรวจพบความผิดปกติระดับโมเลกุลชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน 2 ชนิด คือ initiation codon nt 2 (T-G) และ codon 55 (-A) ความผิดปกติทั้งสองชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมียซึ่งเป็นชนิดที่รุนแรง และจากการใช้เทคนิคโคลนนิ่งและซีเควนซิ่งเพื่อยืนยันความผิดปกติที่โคดอน 55 (-A) ปรากฏว่าได้ผลตรงกับการวิเคราะห์โดยเทคนิคไดเรกซีเควนซิ่ง นอกจากนี้พบว่าความผิดปกติระดับโมเลกุลดังกล่าวคือ initiation codon nt 2 (T-G) และ codon 55 (-A) อยู่ร่วมกับเบส T และ C ที่ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 3 ของโคดอนที่ 2 ตามลำดับ

ดังนั้นวิธีออโตเมทดีเอนเอซีเควนซิงเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและให้ผลที่เชื่อถือได้ สามารถตรวจหาความผิดปกติระดับโมเลกุล ชนิดนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลง การเพิ่มและการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็กแบบโฮโมซัยกัสและเฮเทอโรซัยกัสได้อย่างถูกต้องแม่นยำ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่สามารถตรวจหาความผิดปกติที่มีสาเหตุมาจากการขาดหายของเบต้าโกลบิน (และเดลต้าโกลบิน) ยีน ขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นความผิดปกติที่เคยมีรายงานในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การตรวจหาความผิดปกติชนิดนี้เพื่อวินิจฉัยก่อนคลอด อาจทำได้โดยวิธีวัดสัดส่วนปริมาณฮีโมโกลบินในตัวอย่างเลือดของทารกในครรภ์ (ฟีตัส) โดยเครื่องเอชพีแอลซี (HPCL) ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการกำหนดแนวทางในการควบคุมและหาทางป้องกันการเกิดโรคเบต้าธาลัสซีเมียในภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งเป็นภูมิภาคที่มีอุบัติการของโรคธาลัสซีเมียสูงและก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขและเศรษฐกิจที่สำคัญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved