Thesis Title : Detection of α- Thalassemia 2 Carriers : Rightward Type ($-\alpha^{3.7}$) in Northern Thai Population by Polymerase Chain Reaction Technique

Author : Miss Arunee Hematulin

M.Sc. : Biochemistry

Examining Committee

Associate Professor Dr. Luksana Makonkawkeyoon	Chairman
Associate Professor Dr. Apichart Oranratanachai	Member
Associate Professor Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Member

ABSTRACT

Alpha thalassemia 2 : rightward type ($-\alpha^{3.7}$) is the most common form of a single alpha globin gene deletion resulted from unequal crossover in the Z boxes of alpha globin gene. The carrier state of these deletion has neither clinical symptoms nor hematological abnormalities. But the interaction of alpha thalassemia 2 with alpha thalassemia 1 results in hemoglobin H disease which is the most severe form of the alpha thalassemia phenotypes compatible with life.

Traditionally, identification of the alpha thalassemia 2: rightward type($-\alpha^{3.7}$) may be achieved by DNA mapping and Southern blot analysis. Both procedures are specific but relatively complex, time consuming, cumbersome and require a large amount of genomic DNA. Thus, they are not practical and suitable for the most laboratories.

In this study, the method of polymerase chain reaction (PCR) was applied to examine the alpha thalassemia 2 : rightward type ($-\alpha^{3.7}$). The normal alpha globin gene and alpha 3.7 kb deletion were amplified by difference pairs of specific primers. The PCR products were analyzed on agarose gel electrophoresis. This method was employed to detect the alpha thalassemia 2 : rightward type ($-\alpha^{3.7}$) in 400 genomic DNA samples from Northern part of Thailand. Out of these, 67(16.75 %) possessed in alpha 3.7 kb deletion, the genotype could be identified to - $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$ in 58 (14.5 %), - $\alpha^{3.7}$ / - $\alpha^{3.7}$ in 5 (1.25%), and -- / - $\alpha^{3.7}$ in 4 (1 %). The hematological parameters of these carriers were also determined in this study. In 12 females and 22 males, the hemoglobin concentration, percent of hematocrit and red blood cell count were 12.23 $\pm$ 1.12 (g/dl), 42.21 $\pm$ 6.03 % and 5.07 $\pm$ 0.90 (x 10^9 / l) in females and 13.72 $\pm$ 1.36 (g/dl), 44.23 $\pm$ 3.52 % and 5.21 $\pm$ 0.84 (x 10^9 / l) in males respectively. The mean corpuscular volume were 86.61 $\pm$ 16.95 (fl) and percent of osmotic fragility were 60.3 $\pm$ 13.2 % . All hematological parameters range on the standard cut off of the normal value, no statistical abnormalities can be detected (P=0.05). These results suggested that alpha thalassemia 2 carriers (- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$) can not be identified by hematological routine screening test. The PCR is very useful for detection of these carriers.

Since the population of Northern Thailand has one of the highest frequencies of alpha thalassemia in the world. Characterization of the molecular defects in population is importance for management and controls the spreading of the disease. Detection of the alpha thalassemia 2 : rightward type ($-\alpha^{3.7}$) by PCR technique is convenient, reliable, and suitable for evaluated its prevalence in population, in order to use for genetic counseling, prenatal diagnosis and prevention of the alpha thalassemia in the future.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจวิเคราะห์หาพาหะ α - Thalassemia 2 ชนิด rightward (- $\alpha^{3.7}$) ในประชากรไทยภาคเหนือ โดยเทคนิคโพลิเมอเรสเชนรีแอคชั่น

ชื่อผู้เขียน นางสาว อรุณี เหมะธุลิน

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ลักษณา มกรแก้วเกยูร ประธานกรรมการ

รศ.นพ. อภิชาติ โอฬารรัตนชัย กรรมการ

รศ.ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล กรรมการ

บทคัดย่อ

Alpha thalassemia 2 ชนิด rightward (- $\alpha^{3.7}$) เป็น single alpha globin gene deletion ชนิดที่พบมากที่สุด การขาดหายไปของยีนเป็นผลจากการ unequal crossover ใน Z boxes ของอัลฟ่าโกลบินยีน ผู้ที่เป็นพาหะของยีนชนิดนี้ จะไม่มีอาการของโรค และไม่มีความผิดปกติทางด้านโลหิตวิทยา แต่เมื่อมีการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างผู้ที่เป็น alpha thalassemia 2 กับ alpha thalassemia 1 จะทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอช ซึ่งเป็นโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมียชนิดที่มีความรุนแรงที่สุด ที่ผู้เป็นโรคยังมีชีวิตอยู่ การตรวจวินิจฉัยยีน alpha Thalassemia 2 ชนิด rightward (- $\alpha^{3.7}$) วิธีดั้งเดิมที่ใช้คือ DNA mapping และ Southern blot hybridization ทั้งสองวิธี เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง แต่มีความสลับซับซ้อน ใช้เวลานาน ไม่สะดวกในการใช้งาน และต้องการดีเอ็นเอปริมาณมาก จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การศึกษานี้ได้นำเอาเทคนิค โพลิเมอเรสเชนรีเอคชั่น (PCR) มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ยีน alpha thalassemia 2 ชนิด rightward (- $\alpha^{3.7}$) ยีนอัลฟ่าโกลบินที่ปกติ และยีนของ alpha thalassemia 2 ชนิด rightward (- $\alpha^{3.7}$) จะถูกขยายโดยใช้คู่ของไพรเมอร์จำเพาะที่แตกต่างกัน แล้วนำผลของ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลอกาโรส จากนั้นจึงนำเอาวิธีดังกล่าวมาตรวจวิเคราะห์หายีน alpha thalassemia 2 ชนิด rightward (- $\alpha^{3.7}$) ใน DNA ตัวอย่างของคนไทยภาคเหนือจำนวน 400 ราย จากตัวอย่างทั้งหมดพบว่า

มีผู้ที่มียีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ($-\alpha^{3.7}$) จำนวน 67 รายคิดเป็นร้อยละ 16.75 โดยมี genotype เป็น แบบ $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ จำนวน 58 ราย คิดเป็นร้อยละ 14.5 เป็นแบบ $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.25 และแบบ $--/-\alpha^{3.7}$ จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 1 และในการศึกษานี้ ได้วิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ที่เป็นพาหะของยีนชนิดนี้ ในตัวอย่างจากหญิงจำนวน 12 ราย ในผู้ชายจำนวน 22 ราย พบว่า มีค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน เปอร์เซ็นฮีมาโตคริต และ จำนวนเม็ดเลือดแดง ในผู้หญิง เป็น 12.23 $\pm$ 1.12 (g / dl), 42.21 $\pm$ 6.03 % และ 5.07 $\pm$ 0.90 ($\times 10^{9}$ / l) ในผู้ชายเป็น 13.72 $\pm$ 1.36 (g / dl), 44.23 $\pm$ 3.52 % และ 5.21$\pm$0.84 ($\times 10^{9}$ / l) ตามลำดับ มีค่า mean corpuscular volume เป็น 86.61$\pm$16.95 (fl) และ เปอร์เซ็น osmotic fragility เป็น 60.3 $\pm$ 13.2% ค่าทางโลหิตวิทยาทุกค่า อยู่ในช่วงปกติของค่ามาตรฐาน ไม่พบว่ามีความแตกต่างจากค่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P=0.05 งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า พาหะของ alpha thalassemia 2 ชนิด rightward ($-\alpha^{3.7}$) ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยใช้ลักษณะทางโลหิตวิทยา วิธี PCR จึง เป็นวิธีที่เหมาะสมในการตราจหาภาวะการเป็นพาหะของยีนชนิดนี้

เนื่องจากในประชากรไทยภาคเหนือมีอุบัติการของ alpha thalassemia สูงที่สุดแห่งหนึ่งของโลก การตรวจหาภาวะความผิดปกติของยีนชนิดนี้ ในประชากร จึงมีความสำคัญต่อการจัดการและควบคุมการแพร่ระบาดของโรค การตรวจหายีน alpha thalassemia 2 ชนิด rightward ($-\alpha^{3.7}$) โดยใช้เทคนิค PCR สามารถทำได้ง่าย มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการประเมินหาอุบัติการของยีนในประชากร เพื่อนำไปใช้ในการให้คำปรึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ ใช้ในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเป็นโรคโลหิตจาง alpha thalassemia ในโอกาสต่อไป