ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อการตรวจพาหะธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย
ผู้เขียน	นางสาว วิภาสิริ ศรีสุวรรณ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. ธนูศักดิ์ ตาตุ

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นโรคโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมซึ่งมีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย ประมาณ 40% ของประชากรไทยเป็นพาหะ ดังนั้นการตรวจหาพาหะจึงเป็นวิธีการสำคัญในการควบคุมและการป้องกันโรคนี้ ปัจจุบันการตรวจหาพาหะธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือการคัดกรองตามด้วยการตรวจยืนยัน ซึ่งการตรวจ DNA เป็นวิธีการหนึ่งของขั้นตอนการตรวจยืนยันที่ทำให้ได้การวินิจฉัยพาหะเหล่านี้อย่างถูกต้อง วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา in-house multiplex allele-specific PCR สำหรับตรวจหาความผิดปกติของโกลบินยีนชนิดอัลฟ่าและบีต้า และเพื่อพัฒนาเทคนิค whole blood PCR ที่ไม่ต้องทำการเตรียม DNA หลังจากทำการปรับปรุงปริมาณ primers, ปริมาณ $MgCl_2$ และ จำนวนรอบของ thermal cycles วิธีการ in-house multiplex allele-specific PCR ประสบความสำเร็จในการตรวจหา SEA-α thalassemia 1, α-thalassemia 2 (3.7-kb deletion), Hb Constant Spring และ $\beta^{41/42(-TTCT)}$, $\beta^{17(A-T)}$, β^{E}, $\beta^{-28(A-G)}$ ของอัลฟ่าและบีต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินผิดปกติตามลำดับ วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจพบชนิดของความผิดปกติของโกลบินยีนในตัวอย่างเลือด 57 ตัวอย่างจาก 70 ตัวอย่าง (81.4%) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะใช้วิธีการนี้ตรวจตามหลังการตรวจคัดกรองทันที ส่วนการพัฒนาเทคนิค whole blood PCR ประสบผลสำเร็จเช่นเดียวกัน โดยต้องใช้ betaine (9%; w/v) เป็นสารกระตุ้นปฏิกิริยา, เพิ่มขั้นตอน heat-cool จำนวน 3 และ 10 รอบก่อนรอบ thermal cycle ปกติ และใช้เลือดครบส่วนจำนวน 2 µl ในปริมาตร 50 µl หลังจากนำวิธีการนี้ไปประยุกต์กับ in-house allele-specific PCR พบว่า ประสบผลสำเร็จด้วยดี ในการตรวจหาความผิดปกติของโกลบินยีนชนิดอัลฟ่าและบีต้า สรุปว่าสามารถใช้วิธีการ in-house singleplex and multiplex allele-specific PCR ทั้งแบบที่ใช้ DNA และใช้เลือดครบส่วนหลังการตรวจคัดกรองทันที ทั้งนี้เพื่อวินิจฉัยพาหะธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Development of Simple DNA Analysis Technique for Detecting The Carrier of Thalassemia and Hemoglobinopathies Commonly Found in Thailand
Author	Miss Wibhasiri Srisuwan
Degree	Master of Science (Medical Technology)
Thesis advisor	Assoc. Prof. Dr. Thanusak Tatu

ABSTRACT

Thalassemia and hemoglobinopathies are inherited globin gene disorders commonly found in Thailand. Approximately 40% of Thai population are carriers. Identification of these carriers are important in prevention and control of these disorders. Todate, 2 major steps are employed in the carrier detection comprising initial screen followed by confirmation. DNA analysis is the confirmatory procedure that creates definite diagnosis of these carriers. This thesis was aimed to develop the in-house multiplex allele-specific PCR for detecting α- and β-globin mutations commonly found in Thailand and to invent the whole blood PCR without DNA isolation. After optimizations of amount of primers, $MgCl_2$ and the thermal cycles, the multiplex allele-specific PCR protocols successfully identified SEA-α thalassemia 1, α-thalassemia 2 (3.7-kb deletion),

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Hb Constant Spring and $\beta^{41/42(-TTCT)}$, $\beta^{17(A-T)}$, β^{E}, $\beta^{-28(A-G)}$ for the α- and β-thalassemia/hemoglobinopathies, respectively. These developed in-house multiplex allele-specific PCR protocols could accurately detect globin gene mutations in 57 of 70 (81.4%) unknown blood samples. Thus, the possibility of performing these PCR techniques right after the initial carrier screen was demonstrated. The whole blood PCR was also successfully developed employing 9% (w/v) betaine as PCR facilitator, 3 and 10 "heat-cool" steps prior to typical thermal cycles and 2-μl whole blood in 50-μl PCR reaction. Applying the whole blood PCR in the developed in-house allele-specific PCR successfully and accurately identify the α- and β-globin gene mutations. It was concluded that the developed in-house singleplex and multiplex allele-specific PCR utilizing either genomic DNA or whole blood could be performed right after the initial screen in order to detect the carriers of α- and β- thalassemia and hemoglobinopathies commonly found in Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved