Thesis Title Study of Molecular Background of Hematologically Silent α-thalassemia and Development of Polymerase Chain Reaction to Detect Double Heterozygous α/β-thalassemia Commonly Found in Thais

Author Mr. Surasit Suwannasin

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis advisor Assoc. Prof. Dr. Thanusak Tatu

ABSTRACT

Silent α-thalassemia is characterized by a very mild type of thalassemia, particularly in heterozygous form. Its mild to normal hematological manifestation leads to difficulty in its detection. Moreover, association of α-thalassemia and β-thalassemia could result in a complex thalassemia characterized by fairly mild phenotype or a phenotype typical for only one type of thalassemia. The latter is problematic in genetic consulting. In theory, both of these situations should possess capability of producing Hb Bart's. This thesis was aimed to determine the molecular background of the silent α-thalassemia in sample diagnosed as otherwise normal, but certain amount of Hb Bart's was detected. This thesis was also aimed to develop the so-called "multiplex allele-specific PCR" for the detection

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

of double heterozygotes of α/β-thalassemia and α-thalassemia/HbE in samples initially diagnosed as β-thalassemia trait and HbE trait, but also possessed detectable levels of Hb Bart's. The techniques used for silent α-thalassemia study included *Xmn*I restriction digestion of amplified products to detect the *Xmn*I-$^{G}\gamma$ polymorphism, Gap-PCR to determine the α-thalassemia 2 ($-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$) gentotypes, nucleotide sequencing to detect sequence alterations within and flanking both α1- and α2-globin genes. In addition, the multiplex allele-specific PCR was optimized step-by-step to obtain the optimal amount of all the essential ingradients including DNA target, dNTPs, primers, DMSO and $MgCl_2$. The results demonstrated no *Xmn*I-$^{G}\gamma$ polymorphism and no $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ deletions in all samples analyzed. However, HbCS in heterozygous form was found in one sample while the others had intact nucleotide sequences on the sequenced regions. The multiplex allele-specific PCR was successfully developed and capable to detect α-, β-, and HbE heterozygotes both in single and in double forms. This study indicated that genetic background of silent α-thalassemia in Thais is heterogeneous and that HbCS is one of thaose genetic etiologies. Hb Bart's leveling could be helpful in this situation. This study also demonstrated the high ability of the newly developed molecular diagnostic tool that can be applicable in screening for double heterozygotes of α/β-thalassemia and α-thalassemia/HbE; the complex form of thalassemia that could exist in Thailand and other countries where this thalassemia and hemoglobinopathies are common.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาพื้นหลังระดับโมเลกุลของอัลฟ่าธาลัสซีเมียชนิดไม่แสดงออกทางโลหิตวิทยาและการพัฒนาวิธีการขยายสารพันธุกรรมเพื่อตรวจหาพาหะซ้อนของอัลฟ่าและเบต้าธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในคนไทย
ผู้เขียน	นายสุรสิทธิ์ สุวรรณสินธุ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.ธนูศักดิ์ ตาตุ

บทคัดย่อ

Silent α-thalassemia เป็นธาลัสซีเมียที่ไม่แสดงอาการ มักไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาที่ชัดเจนโดยเฉพาะกรณีที่เป็นพาหะ ซึ่งทำให้การตรวจคัดกรองทำได้ยาก ยิ่งไปกว่านั้น การอยู่ร่วมกันของ α-thalassemia และ β-thalassemia อาจจะให้มีอาการที่เบาหรือมีการแสดงออกเหมือนกับธาลัสซีเมียเพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดปัญหาในการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมของโรคนี้ ในทางทฤษฎี Hb Bart's สามารถถูกสร้างขึ้นได้ผู้ที่เป็น α-thalassemia ไม่ว่าจะอยู่รูปแบบเดี่ยวหรืออยู่ร่วมกับ β-thalassemia การศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความผิดปกติระดับโมเลกุลของตัวอย่างเลือดที่ได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าปกติ แต่ตรวจพบ Hb Bart's ระดับหนึ่ง การศึกษานี้ยังมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนา multiplex allele-specific PCR เพื่อใช้ในการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจตัวอย่างเลือดที่ได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าเป็นพาหะ β-thalassemia และพาหะ HbE แต่มีระดับ Hb Bart's สูงขึ้น การศึกษาเพื่อค้นหาภาวะ silent α-thalassemia ประกอบด้วยการตรวจหา *Xmn*I-$^{G}\gamma$ polymorphism ด้วยวิธีการย่อย PCR products ด้วยเอ็นไซม์ *Xmn*I, ตรวจหา α-thalassemia 2 ชนิด -α $^{3.7}$ และ -α $^{4.2}$ ด้วยวิธีการ Gap-PCR และตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน α1-globin และ α2-globin โดยวิธีตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนั้นการค้นสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค multiplex allele-specific PCR ทำตามลำดับขั้นตอนเพื่อให้ได้ปริมาณที่เหมาะสมของ DNA, dNTPs, primers, DMSO และ $MgCl_2$ จากการศึกษาไม่พบ *Xmn*I-$^{G}\gamma$ polymorphism, α-thalassemia 2 (-α $^{3.7}$, -α $^{4.2}$) ในทุกตัวอย่าง อย่างไรก็ตามพบพาหะ HbCS ในตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง ในขณะที่ไม่พบความผิดปกติในลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ตรวจของตัวอย่างที่เหลือ การพัฒนาเทคนิค multiplex allele-epecific PCR ประสบผลสำเร็จด้วยดีและมีความสามารถในการตรวจหาภาวะ double heterozygotes ของ α- และ β-thalassemia ได้ การศึกษาครั้งนี้บ่งบอกว่ากลไกระดับโมเลกุลของ silent α-thalassemia มีความหลากหลาย และ HbCS เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิด silent α-thalassemia การตรวจหาระดับ Hb Bart's สามารถช่วยการวินิจฉัยภาวะนี้ได้ การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการตรวจระดับโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นใหม่มีความสามารถสูงในการตรวจภาวะพาหะซ้อนของ α/β-thalassemia และ α-thalassemia/HbE ซึ่งอาจจะมีในประเทศไทยและประเทศอื่นๆที่มีอุบัติการณ์ของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved