DETECTION OF β-THALASSEMIA MUTATIONS USING A MULTIPLEX AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM POLYMERASE CHAIN REACTION (MARMS-PCR)

ANCHALEE THEDSAWAD

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(CLINICAL PATHOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

DETECTION OF β-THALASSEMIA MUTATIONS USING A MULTIPLEX AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM POLYMERASE CHAIN REACTION (MARMS-PCR)

ANCHALEE THEDSAWAD 4836317 RACP/M

M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORS: SUMALEE JINDADAMRONGWECH, Ph.D., PUNNEE BUTTHEP, Ph.D., SUPORN CHUNCHARUNEE, M.D.

ABSTRACT

Beta-thalassemia is a heterogeneous group of inherited disorders. In Thailand, the gene frequencies of β-thalassemia vary between 3-9%. Many techniques based on the polymerase chain reaction (PCR) have been developed for the detection of previously identified mutations. This study was intended to design primers and develop multiplex amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (MARMS-PCR) protocols for detection of the most common, less common and uncommon Thai β-thalassemia mutations. From nineteen β-globin gene mutations, MARMS primers were designed to detect 11 β-thalassemia mutations (codon 14/15 (+G), codon 15 (-T), codon 19 (A-G), codon 26(G-T), codon 27/28 (+C), codon 35 (C-A), codon 41 (-C), codon 43 (G-T), codon 95 (+A), codon 123-125 (-ACCCCACC), position -86 (C-G)). Primers for the other 8 mutations followed the design of Bhardwaj U *et al.* Two hundred fifty two β-thalassemia alleles of 250 Thai samples (178 β-Thal trait, 2 homo β-Thal, 70 HbE-β-Thal) were analysed for β-globin gene mutations. Each sample was initially amplified using multiplex mutation group 1,group 2, group 3 and group 4 protocols, respectively. Fourteen different mutations were identified, of which five common ones accounted for 83.4% including codon41/42 (-CTTT), codon17 (A→T), position-28 (C→G), IVSII-654 (C→T) and IVSI-5 (G→C) mutations. The spectrum of β-thalassemia mutations was similar to that previously reported. Hematological findings showed that the presence of position-28 β^+ transcriptional mutation had higher values of most hematological parameters than β^0-thalassemia and severe β^+-thalassemia mutations. The codon19 mutation had the lowest mean HbA_2 in heterozygous β-thalassemia group, the lowest mean HbF, and the highest mean HbA in β^+-thalassemia/HbE group. The coexistence of β-thalassemia and α-thalassemia modified the expression of Hb becoming higher than β-thalassemia with normal α-globin genes. PCR conditions were successfully optimized for multiplex amplifications of nineteen β-thalassemia mutations. This method can be applied for routine detection of β-thalassemia mutations.

KEY WORDS: β-THALASSEMIA / MULTIPLEX AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM POLYMERASE CHAIN REACTION (MARMS-PCR)

132 pp.

การตรวจหา β-thalassemia mutation โดยใช้ multiplex amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (MARMS-PCR) (DETECTION OF β-THALASSEMIA MUTATIONS USING A MULTIPLEX AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM POLYMERASE CHAIN REACTION (MARMS-PCR))

อัญชลี เทศสวัสดิ์ 4836317 RACP/M

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุมาลี จินดาดำรงเวช, ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์), พรรณี บุตรเทพ, ปร.ด. (วิทยาศาสตร์การแพทย์), สุภร จันท์จารุณี, พ.บ.

บทคัดย่อ

เบต้าธาลัสซีเมียเป็นกลุ่มของความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทย โดยมีความชุกร้อยละ 3-9% ได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจหามิวเตชั่นที่เป็นสาเหตุของเบต้าธาลัสซีเมียโดย อาศัยปฏิกิริยา polymerase chain reaction ขึ้นหลายวิธี การศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบ primers สำหรับตรวจหามิวเตชั่นที่พบได้ในคนไทยทั้งชนิดที่พบได้บ่อยและพบได้ยากทั้งหมด 19 ชนิด โดยใช้วิธี multiplex amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (MARMS-PCR) ซึ่งได้ออกแบบ primers สำหรับตรวจมิวเตชั่น 11 ชนิด ได้แก่ codon 14/15 (+G), codon 15 (-T), codon 19 (A-G), codon 26(G-T), codon 27/28 (+C), codon 35 (C-A), codon 41 (-C), codon 43 (G-T), codon 95 (+A), codon 123-125 (-ACCCCACC), position -86 (C-G) ส่วนมิวเตชั่นอีก 8 ชนิด ใช้ primers ตาม Bhardwaj U และคณะ โดยแบ่ง primers ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามมิวเตชั่นที่พบได้บ่อยไปจนถึงที่พบได้ยาก สำหรับตรวจคนไข้เบต้าธาลัสซีเมีย 250 ราย ซึ่งเป็นพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย 178 ราย โฮโมซัยกัสเบต้าธาลัสซีเมีย 2 ราย และ เบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี 70 ราย โดยเริ่มหาชนิดของมิวเตชั่นจากมัลติเพล็กมิวเตชั่นกลุ่ม 1, กลุ่ม 2, กลุ่ม 3 และกลุ่ม 4 ตามลำดับ มิวเตชั่นที่เป็นสาเหตุของเบต้าธาลัสซีเมียในการศึกษาครั้งนี้พบได้ 14 ชนิด ซึ่ง 5 ชนิดแรกที่พบได้บ่อยที่สุด คือ codon 41/42 (-CTTT), codon 17 (A-T), position-28 (C-G), IVSII-654 (C-T) และ IVSI-5 (G-C) คิดเป็น 83.4% ของจำนวนคนไข้ทั้งหมด การศึกษาลักษณะทางโลหิตวิทยาแสดงถึงมิวเตชั่นที่ position-28 ซึ่งเป็นเบต้าบวกธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรงมีค่า hematological parameters สูงกว่ากลุ่มเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมียและเบต้าบวกธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง มิวเตชั่นชนิด codon 19 มีค่า HbA_2 ต่ำที่สุดในกลุ่มพาหะเบต้าธาลัสซีเมีย แต่มีค่า HbF ต่ำที่สุด และมีค่า HbA สูงที่สุดในกลุ่มเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี นอกจากนั้นในคนไข้เบต้าธาลัสซีเมียที่มีแอลฟ่าธาลัสซีเมียร่วมด้วยจะมีค่า Hb สูงขึ้นกว่าในคนไข้ที่เป็นเบต้าธาลัสซีเมียอย่างเดียว ในการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการปรับสัดส่วนต่างๆของการเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเหมาะสม สำหรับตรวจมิวเตชั่นของเบต้าโกลบิน 19 ชนิด โดยวิธี MARMS-PCR ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจในงานประจำได้

132 หน้า