Project Code: PDF44/2540

Project Title: Study on the stability of β-thalassemia mRNA: a novel approach for mRNA quantitation.

Investigators: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakarinwirot University, Sukumvit 23, Bangkok 10110, THAILAND.

E-mail Address: yuwadee@psm.swu.ac.th

Project Period: August 1, 1997 - July 31, 1999

Objectives:

1. To develop a convenient and reliable technique for mRNA quantitation in order to give a better reproducible results than the classical methods.
2. Study the mRNA stability in β-Thalaassemia patients in Thailand using the technique from 1.

ABSTRACT: β-thalassemia and hemoglobin (Hb) E patients, with seemingly identical genotype, have a remarkable variability in severity. As most of β-thalassemia mutations normally exhibit recessive inheritance resulting in a reduced or no β-globin chain synthesis. Therefore, many groups tried to quantify the amount of β-globin mRNA whether there is a correlation with the reduced β-globin chain. Premature termination mRNA is also unstable but no significant systematic attempts to look at mRNA stability among different genotypes. In this work, the one-step real time PCR has been performed as it detected the amount of mRNA in real time during log phase of amplicon accumulation. This circumvents many other problems associated with quantitation in the plateau stage of a PCR amplification. The results show the increase in α/β mRNA ratio (2.4-9.4) in β-thalassemia/Hb E patients with chain termination mutation as compare to normal controls (1.0-1.2) and Hb E traits (1.7-2.6). This could be due to the pathway called nonsense-mediated mRNA decay (NMD) which accelerated the degradation of unstable mRNA that could be toxic to cells and not be translated along their full length in β-thalassemia/Hb E patients. The difference in α/β mRNA in β-thalassemia/Hb E patients with the same genotype could be due to the difference in NMD activity in each individual. Interestingly, the α/β mRNA ratio in normal control is approximately 1.0, which correlates to the α/β globin chain synthesis ratio of 1:1. However, the previous report showed that the α/β globin mRNA ratio is about 4.3 in normal control by using the two-step RT-PCR followed by detection and quantitation of PCR products on a non-denaturating gel, and densitometric scanning of the autoradiograms. To confirm that the α/β mRNA ratio obtained by real-time PCR detection is not an artifact, the α/β globin DNA ratio in normal control was determined. The result indicates that α/β globin DNA ratio is approximately 1.9, which correlates with the α/β globin gene ratio of 2.0.

Key word: **Real-time PCR, β-thalassemia/HbE, mRNA**

สัญญาเลขที่: PDF44/2540

ชื่อโครงการ: การศึกษาความเสถียรของเบต้า-โกลบินยีน : วิธีการแบบใหม่ในการหาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ

หน่วยงาน: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

E-mail Address: yuwadee@psm.swu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 สิงหาคม 2540 – 31 กรกฎาคม 2542

วัตถุประสงค์:
1. เพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่ที่ง่าย สะดวก และให้ Reproducible results กว่าวิธีเดิมในการหาปริมาณ mRNA
2. นำเทคนิคจากข้อ 1 ไปศึกษาหาความเสถียรของ mRNA (mRNA stability) ในคนไข้เบต้า-ธาลัสซีเมีย (β-thalassemia) ในประเทศไทย

บทคัดย่อ: ในผู้ป่วย β-thalassemia/HbE ที่มี Genotype เหมือนกันพบว่ามีความแตกต่างในความรุนแรงของโรค เนื่องจากβ-thalassemia มีการถ่ายทอดแบบ Recessive inheritance ทำให้เกิดการสร้าง β-globin chain ลดลงหรือไม่สร้างเลย ดังนั้นมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามที่จะศึกษาหาปริมาณ β-globin mRNA ว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณของ Globin chain ที่ลดลงหรือไม่ ตามความเป็นจริงแล้ว Premature termination mRNA นั้น ไม่เสถียร แต่ยังไม่มีวิธีการใดที่จะพิสูจน์ได้จริงถึง mRNA stability ใน Genotypes ต่างๆ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้นำเทคนิค One step real time PCR มาใช้เพราะเป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบหาปริมาณ mRNA ในทุกๆ รอบระหว่าง Log phase ของการเกิด PCR products ทำให้การหาปริมาณเป็นไปอย่างถูกต้องเทียบกับการทำ PCR ทั่วไป ซึ่งหาปริมาณ mRNA ในช่วง Plateau state ผลการทดลองพบว่า α/β mRNA ratio ในผู้ป่วย β-thalassemia/HbE อยู่ในช่วง 2.4 ถึง 9.4 ซึ่งสูงกว่าใน Normal control (1.0-1.2) และ Hb E traits (1.7-2.6) แสดงว่า มีการลดลงของ β mRNA การที่ผู้ป่วยที่มี Genotype เหมือนกันแต่มีค่า α/β mRNA ratio ต่างกันเนื่องจาก ในแต่ละคนมีความแตกต่างกันใน Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway ซึ่งเป็น Pathway ที่เซลล์จะทำลาย Premature termination mRNA ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ ทำให้มีผลต่อปริมาณของ β mRNA ที่น่าสนใจคือ α/β mRNA ratio ในคนปกติ มีค่าประมาณ 1 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ α/β Globin chain (1:1) อย่างไรก็ตาม มีความแตกต่างจากผลการทดลองกลุ่มอื่นที่รายงานว่า α/β mRNA ratio ในคนปกติ มีค่าประมาณ 4 แต่ใช้เทคนิคที่ต่างกัน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าเทคนิคทาง Real time PCR เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ ถูกต้องเชื่อถือได้ จึงได้ทำการทดลองหาปริมาณ α/β DNA ratio เพื่อเปรียบเทียบกับจำนวน Gene copy (α:β = 4:2) ว่าสอดคล้องกันหรือไม่ ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า ปริมาณ α/β DNA ratio มีค่าประมาณ 1.9

Key word: Real-time PCR, β-thalassemia/HbE, mRNA