

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความเสถียรของเบต้า-ไกลบินีน : วิธีการแบบใหม่ในการหา  
ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ

โดย ผศ.ดร.ยวดี วัฒนโกศลสิน และคณะ

กรกฎาคม พ.ศ. 2542

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความเสถียรของเบต้า-ไกลบินีน : วิธีการแบบใหม่ในการหาปริมาณ  
เอ็มอาร์เอ็นเอ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ผศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศลสิน

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มศว.

ศ. ดร.ประพนธ์ วิไลรัตน์  
(นักวิจัยที่ปรึกษา)

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์ ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าได้ทำโครงการฯ นี้ จนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดียิ่งในการให้คำปรึกษา ความรู้และเทคนิคต่างๆ รวมทั้งการทำหน้าที่ที่สมบูรณ์แบบที่สูงสุดในฐานะนักวิจัยที่ปรึกษา (Mentor) ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นพ. สุทัศน์ พุฒเจริญ และดร. ปราณี พุฒเจริญ ในการรวบรวมข้อมูลทางคลินิกในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และอนุเคราะห์ตัวอย่างโลหิตของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ตลอดจนให้คำปรึกษา ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการฯ ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม ผู้อำนวยการ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ในการอนุเคราะห์เครื่องมือที่จำเป็นต่อโครงการฯ ขอขอบคุณโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกคน

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มศว. ประสานมิตร ท้ายสุดนี้ ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำงานวิจัยโครงการฯ นี้ จนสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ผศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศลสิน

**Project Code:** PDF44/2540

**Project Title:** Study on the stability of  $\beta$ -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  $\beta$ -Thalassemia patients in Thailand using the technique from 1.

**ABSTRACT:**  $\beta$ -thalassemia and hemoglobin (Hb) E patients, with seemingly identical genotype, have a remarkable variability in severity. As most of  $\beta$ -thalassemia mutations normally exhibit recessive inheritance resulting in a reduced or no  $\beta$ -globin chain synthesis. Therefore, many groups tried to quantify the amount of  $\beta$ -globin mRNA whether there is a correlation with the reduced  $\beta$ -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  $\alpha/\beta$  mRNA ratio (2.4-9.4) in  $\beta$ -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  $\beta$ -thalassemia/Hb E patients. The difference in  $\alpha/\beta$  mRNA in  $\beta$ -thalassemia/Hb E patients with the same genotype could be due to the difference in NMD activity in each individual. Interestingly, the  $\alpha/\beta$  mRNA ratio in normal control is approximately 1.0, which correlates to the  $\alpha/\beta$  globin chain synthesis ratio of 1:1. However, the previous report showed that the  $\alpha/\beta$  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-denaturing gel, and densitometric scanning of the autoradiograms. To confirm that the  $\alpha/\beta$  mRNA ratio obtained by real-time PCR detection is not an artifact, the  $\alpha/\beta$  globin DNA ratio in normal control was determined. The result indicates that  $\alpha/\beta$  globin DNA ratio is approximately 1.9, which correlates with the  $\alpha/\beta$  globin gene ratio of 2.0.

**Key word:** Real-time PCR,  $\beta$ -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. เพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่ที่ย่าง สะดวก และให้ Reproducible results กว่าวิธีเดิมในการหาปริมาณ mRNA  
2. นำเทคนิคจากข้อ 1 ไปศึกษาหาความเสถียรของ mRNA (mRNA stability) ในคนไข้เบต้า-ธาลัสซีเมีย ( $\beta$ -thalassemia) ในประเทศไทย

บทคัดย่อ: ในผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia/HbE ที่มี Genotype เหมือนกันพบว่ามีค่าความแตกต่างในความรุนแรงของโรค เนื่องจาก  $\beta$ -thalassemia มีการถ่ายทอดแบบ Recessive inheritance ทำให้เกิดการสร้าง  $\beta$ -globin chain ลดลงหรือไม่สร้างเลย ดังนั้นมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามที่จะศึกษาหาปริมาณ  $\beta$ -globin mRNA ว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณของ Globin chain ที่ลดลงหรือไม่ ตามความเป็นจริงแล้ว Premature termination mRNA นั้น ไม่เสถียร แต่ยังไม่มีการใดที่จะพิสูจน์ได้จริงถึง 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  $\alpha/\beta$  mRNA ratio ในผู้ป่วย  $\beta$ -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  $\beta$  mRNA การที่ผู้ป่วยที่มี Genotype เหมือนกันแต่มีค่า  $\alpha/\beta$  mRNA ratio ต่างกันเนื่องจาก ในแต่ละคนมีความแตกต่างกันใน Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway ซึ่งเป็น Pathway ที่เซลล์จะทำลาย Premature termination mRNA ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ ทำให้มีผลต่อปริมาณของ  $\beta$  mRNA ที่น่าสนใจคือ  $\alpha/\beta$  mRNA ratio ในคนปกติ มีค่าประมาณ 1 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ  $\alpha/\beta$  Globin chain (1:1) อย่างไรก็ตาม มีความแตกต่างจากผลการทดลองกลุ่มอื่นที่รายงานว่า  $\alpha/\beta$  mRNA ratio ในคนปกติ มีค่าประมาณ 4 แต่ใช้เทคนิคที่ต่างกัน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าเทคนิคทาง Real time PCR เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ ถูกต้องเชื่อถือได้ จึงได้ทำการทดลองหาปริมาณ  $\alpha/\beta$  DNA ratio เพื่อเปรียบเทียบกับจำนวน Gene copy ( $\alpha:\beta = 4:2$ ) ว่าสอดคล้องกันหรือไม่ ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า ปริมาณ  $\alpha/\beta$  DNA ratio มีค่าประมาณ 1.9

Key word: Real-time PCR,  $\beta$ -thalassemia/HbE, mRNA

## Executive Summary

### 1. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

เบต้า-ธาลัสซีเมีย ส่วนใหญ่เกิดจากการผ่าเหล่า (Mutation) ของโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเบต้า-โกลบิน (1) ในโรคเบต้า-ธาลัสซีเมียซึ่งเกิดจากการผ่าเหล่าแบบ Nonsense-mutation หรือ Premature termination นั้น ในประเทศไทยส่วนใหญ่พบในโคดอนที่ 17 หรือเกิด Frameshift mutation (4 Base-pair deletion) ในโคดอน 41, 42 จะมีการสร้างโปรตีน (สายโกลบิน) ลดลง ส่วนความเสถียรของ mRNA ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาปริมาณ mRNA มีหลายเทคนิคแต่ก็ยังให้ผลที่ไม่แน่นอน ในเชิงปริมาณ (Quantitation) และยังมีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน

### 2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 เพื่อพัฒนาหาเทคนิคใหม่ที่ยง่าย และสะดวก และให้ Reproducible result กว่าวิธีเดิมในการหาปริมาณ mRNA

2.2 นำผลที่ได้ไปศึกษาความเสถียรของ mRNA ในคนไข้เบต้า-ธาลัสซีเมีย

### 3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากคนไข้เบต้า-ธาลัสซีเมีย ชนิดต่างๆ

3.2 สกัดแยก RNA

3.3 นำ RNA มาทำปฏิกิริยา One step RT-PCR โดยใช้ Real-time PCR detection system ด้วยเครื่อง ABI PRISM 7700 Perkin Elmers

3.4 คำนวณหาความเข้มข้นของ mRNA เปรียบเทียบและแปลผล

### 4. ผลการทดลอง

การหาปริมาณ mRNA โดย Real-time PCR detection นั้น มีความจำเพาะสูงเนื่องจากในการทดลอง Probe จะต้อง Hybridize กับ Template และจะ Detect พบการเรืองแสงได้ก็ต่อเมื่อมีปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้น และ Probe จะต้องเข้าไป Hybridize เท่านั้น นอกจากนั้นยังเป็นวิธีการที่เชื่อถือได้เนื่องจากเป็นการตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาในทุกๆ รอบของการเกิดปฏิกิริยา PCR โดยผลการทดลองพบว่า ในคนไข้  $\beta$ -thal/Hb E ( $\beta^{4bp}$ -thalassemia/Hb E และ  $\beta^{17}$ -thalassemia/Hb E) จำนวน 20 ราย  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio = 2.4 - 9.4, Hb level = 5.3 - 9.1 g/dl และในคนไข้  $\beta^+$ -thal/Hb E ( $\beta^{28}$ -thalassemia/Hb E และ  $\beta^{654}$ -thalassemia/Hb E) จำนวน 11 ราย พบว่า  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio = 3.1 - 5.1, Hb level = 5.4 - 11.0 g/dl นอกจากนั้นในคนไข้ Hb E traits จำนวน 8 ราย พบว่า  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio = 1.71 - 2.65, Hb level = 12.0 - 13.5 g/dl การที่  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ในผู้ป่วย  $\beta$ -thal/Hb E มีค่าสูงกว่าใน  $\beta^+$ -thal/Hb E ซึ่งมีค่าสูงกว่าใน Normal control และ Hb E traits นั้น อาจเนื่องมาจาก Premature mRNA ที่ไม่เสถียร และอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ดังนั้น mRNA เหล่านี้จะถูกทำลายโดย NMD pathway ซึ่งในผู้ป่วยแต่ละรายมี Activity ของ NMD ที่ต่างกันออกไปทำให้ผู้ป่วยที่มี Genotype เหมือนกันแต่มีค่า  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio แตกต่างกัน และที่น่าสนใจก็คือ  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio ใน Normal control จำนวน 6 ราย เท่ากับประมาณ 1.0 - 1.2 ในขณะที่ Hb level จะมีปริมาณเท่ากับ 14.0 - 15.0 g/dl ซึ่งต่างจากรายงานของ Smetanina et al (2) ซึ่งพบว่า  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ใน Normal control ประมาณ 4.4 อย่างไรก็ตามการหา mRNA ของทั้งสองกรณีนี้ใช้เทคนิคที่ต่างกัน ซึ่งการทดลองโดยใช้ Real-time PCR detection ได้มีการตรวจสอบความถูกต้องโดยหาปริมาณ  $\alpha/\beta$  Globin DNA ratio พบว่า มีค่าประมาณ 1.9 ซึ่งก็สอดคล้องกับจำนวนอัตราส่วน Gene copies ของ  $\alpha:\beta$  DNA = 4:2

## เนื้อหางานวิจัย

### 1. บทนำ

โรคธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อย และเป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศไทยโรคหนึ่ง โดยเฉลี่ยประชากรไทย ประมาณ 3-9% เป็นพาหะของเบต้า-ธาลัสซีเมีย (3)

เบต้า-ธาลัสซีเมีย เกิดจากร่างกายสร้างสายเบต้า-โกลบินของฮีโมโกลบินในปริมาณที่น้อยกว่าปกติ หรือไม่สร้างเลยทำให้สายโกลบินที่ไม่มีความผิดปกติ (เช่นสายอัลฟา-โกลบิน) มีปริมาณเกินดุลสายโกลบินที่เกินมาอยู่ภายในเม็ดเลือดแดงนี้ ทำให้เม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติ และถูกทำลายได้ง่าย เกิดเป็น Hemolytic anemia ทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีด เหลือง ดับม้ามโต เจริญเติบโตช้า มีการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มมากกว่าปกติ เพื่อทดแทนเม็ดเลือดแดงที่แตกทำลายไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระดูก ทำให้กระดูกใบหน้าเปลี่ยนไปมีลักษณะที่เรียกว่า “ใบหน้าธาลัสซีเมีย” และมีความผิดปกติอื่นๆของร่างกายอีกหลายประการ (4)

ปัจจุบันพบว่าเบต้า-ธาลัสซีเมียส่วนใหญ่ เกิดจากการผ่าเหล่า (Mutation) ของโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเบต้า-โกลบิน (1) ในประเทศไทยพบชนิดของการผ่าเหล่าของเบต้า-ธาลัสซีเมียแล้วมากกว่า 20 ชนิด ส่วนใหญ่เป็น Point mutation คือมีการเปลี่ยนแปลงไปของชนิดของเบส หรือเบสจำนวนน้อยๆ ขาดหายไป หรือเพิ่มขึ้นบนสาย DNA (4-8) เบต้า-ธาลัสซีเมียส่วนน้อยเกิดจากเบต้าโกลบินยีนบางส่วน หรือทั้งยีนแห้วหายไปจากโครโมโซม (8) ซึ่งเมื่อเกิดการผ่าเหล่าดังกล่าวมีผลให้ปริมาณของเบต้า-โกลบินลดลงไปด้วย

ในโรคเบต้า-ธาลัสซีเมียซึ่งเกิดจากการผ่าเหล่าแบบ Translation termination mutation หรือ Nonsense mutation (CUG ---->UAG) ที่ตำแหน่ง Codon 39 ของเบต้า-โกลบินยีน จึงเรียกว่า  $\beta^0$ -39 Thalasssemia มีการศึกษาพบว่าปริมาณของโปรตีนลดลง และปริมาณของ mRNA ก็ลดลงด้วย (9-11) ซึ่งในอดีตมีการศึกษาหาปริมาณของ mRNA โดยใช้เทคนิค Northern blot hybridization ซึ่งมีข้อเสียคือ ต้องใช้ mRNA ปริมาณมาก ซึ่งเป็นปัญหาในการสกัด mRNA จากเลือดคนไข้ซึ่งต้องใช้เลือดปริมาณมาก นอกจากนั้นยังต้องใช้สารกัมมันตรังสี (Radioactive probe) ในการตรวจจับซึ่งเป็นอันตราย และมีราคาค่อนข้างสูงตลอดจนมีปัญหาในการกำจัดทิ้ง

ในประเทศไทยส่วนใหญที่พบจะเนื่องมาจาก Nonsense mutation ใน Codon 17 หรือเกิด Frameshift mutation (4 Base-pair deletion) ใน Codon 41, 42 จะมีการสร้างโปรตีนลดลง ส่วนความเสถียรของ mRNA ยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงพยายามหาวิธีที่ง่ายกว่า วิธี

ดั้งเดิมในการหาปริมาณ mRNA จากอัลลีลของเบต้า-ไกลบินีน เพื่อดูว่าในเบต้า-ธาลัสซีเมียที่มี Frameshift mutation หรือ Nonsense mutation นั้นจะเกิดการ Destabilization of mRNA หรือไม่ และการ Destabilization of mRNA นี้เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้ทั่วไปหรือไม่ (A universal phenomenon) ในการผ่าเหล่าชนิดต่างๆ ในคนไข้ เบต้า-ธาลัสซีเมีย ดังนั้นในการศึกษาจึงมีความจำเป็นที่ต้องหาวิธีที่ง่าย กว่าวิธีดั้งเดิม (Simpler method) และสะดวกในการหาปริมาณ mRNA ในคนไข้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาที่ต้องการทราบถึงปริมาณ และความเสถียรของ mRNA ในคนไข้ชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย

### Real Time Detection PCR

เนื่องจากเทคนิคในการหาปริมาณ mRNA แบบใหม่โดยวิธี Real time detection PCR มีความถูกต้องและแม่นยำกว่าวิธีอื่นๆ เทคนิคแบบใหม่ซึ่งมีหลักการดังนี้

โดยทั่วไปในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA โดยเทคนิคทาง Real time detection PCR ประกอบด้วย

1. Specific primers
2. Specific fluorescent labelled probes
3. RNA

Real time PCR มีหลักการทำงานคือ Primers ที่ใช้จะเป็นแบบปกติทั่วไปคือ Specific primers ซึ่งมีความจำเพาะสำหรับ DNA/RNA template แต่ละชนิด ส่วน Probes ที่ใช้จะเป็นแบบพิเศษคือนอกจากจะมีลำดับเบสคู่สม (Complementary) กับลำดับเบสบนเส้นดีเอ็นเอแล้ว Probes นั้นจะถูกติดฉลาก (Labelled) โดยสารฟลูออเรสเซนต์ได้ Fluorogenic probes โดยปลายด้าน 5' end จะถูกติดฉลากด้วย A quencher fluorescent dye ส่วนปลาย 3' end ก็จะถูกติดฉลากด้วย A reporter fluorescent dye โดยเมื่อ Probes เข้าไปจับกับ DNA target แล้ว Reporter และ Quencher จะอยู่ใกล้กันในระยะที่ Quencher จะไปลดแสง Fluorescence ที่ปล่อยออกมาจาก Reporter โดยปรากฏการณ์นี้เรียกว่า Forster resonances energy transfer through space

โดยอาศัยการทำงานของ Taq DNA polymerase ใน PCR พบว่าคุณสมบัติ 5' nuclease activity ของ Taq DNA polymerase สามารถตัดด้าน 5' end ของ Probe ได้ ดังนั้น Quencher จะถูกตัดออก ทำให้แสง Fluorescence จาก Reporter ถูกปล่อยออกมาแล้วตรวจพบได้ ดังนั้นในการขยายจำนวนของดีเอ็นเอในแต่ละรอบ Quencher จะถูกตัดออกทำให้ Detect แสง Fluorescence จาก Reporter ได้เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ในแต่ละรอบของ PCR

อุปกรณ์ที่ใช้ คือ ABI PRISM 7700 Sequence Detector ใช้ในการตรวจจับฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent signal) ระหว่างการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอในแต่ละรอบ



## Real Time Methodology

มี Parameter  $C_T$  (Threshold cycle) ซึ่งก็คือ Fractional cycle number ณ จุดที่ Reporter fluorescence ของ Probe ถูกปล่อยออกมาโดยผ่านจุดต่ำสุด (A fixed threshold) ที่อยู่เหนือ Baseline ดังนั้น เมื่อนำค่า Log initial target copy number for a set of standards มา plot กับ  $C_T$  จะได้เส้นตรง ดังนั้นการหาปริมาณของ RNA ที่ต้องการ (Target) ใน Unknown samples จะทำได้โดยหาค่า  $C_T$  ของ unknown แล้วไปเทียบกับ Standard curve เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้สามารถหา Threshold cycle ได้ในขณะที่ PCR amplification ยังอยู่ใน Exponential phase ดังนั้นเป็นเหตุผลที่อธิบายได้ว่าทำไม  $C_T$  จึงเป็นการวัดที่ไวใจได้ (Reliable measurement) โดยการวัด Starting copy มากกว่าการวัด Endpoint ของ PCR product ที่เกิดขึ้น ระหว่าง Exponential phase จะไม่มีส่วนประกอบตัวใดในปฏิกิริยาที่ถูกจำกัด ดังนั้นค่า  $C_T$  จึงเป็นค่าที่ Reproducible สำหรับปฏิกิริยาที่มี Starting copy number เหมือนกัน ดังนั้นจึงเป็นการนำไปสู่การปรับปรุงด้านความเที่ยงตรง (Improved precision) ในการหาปริมาณของ DNA และ RNA ในทางตรงกันข้ามการหาปริมาณของ PCR product ที่ได้โดยทั่วไปคือดูจาก Product ขั้นสุดท้าย (End product) ตอนสุดท้ายของรอบสุดท้ายจะ Sensitive ต่อการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของส่วนประกอบในปฏิกิริยา ทั้งนี้เนื่องจาก Endpoint measurements จะใช้ก็เมื่อปฏิกิริยานั้นอยู่เกินกว่า Exponential phase และการเปลี่ยนแปลงในส่วนประกอบเพียงเล็กน้อยจะมีผลอย่างมากต่อ Final amount of product

ตัวอย่างของ ปฏิกิริยาข้างเคียง เช่น การเกิด Primer dimers จะใช้สารในปริมาณต่าง ๆ กันในแต่ละการทดลอง ดังนั้นเป็นไปได้ว่า สารตัวอย่างที่มีปริมาณเริ่มต้นมาก จะได้ Product มีปริมาณน้อยกว่าสารตัวอย่างที่มีปริมาณเริ่มต้นน้อยกว่าความแตกต่างระหว่าง End point กับ Real time detection

## Advantages of Real Time

1. การใช้ Real time kinetics ของ PCR ช่วยให้ได้ไม่ต้องใช้ Competitor (in tube standard) การหาปริมาณทำได้โดยการเตรียม Standard curve และหา Unknown copy number โดยเปรียบเทียบกับ Standard curve หากเปรียบเทียบกับ End point measurements การใช้  $C_T$  ช่วยขยายการหาปริมาณเพราะข้อมูลจะถูกสะสมสำหรับทุกๆ รอบของ PCR
2. ไม่มี Post-PCR processing ซึ่งเป็นการลด Carryover contamination และเป็นการกำจัด error ที่เกิดจาก Post-PCR processing
3. นอกจากนั้น ค่า  $C_T$  ยัง Sensitive ต่อ PCR น้อยกว่าค่า Endpoint ทั้งนี้เพราะเป็นการวัดจากช่วง Exponential phase ซึ่งส่วนประกอบในปฏิกิริยายังไม่ถูกจำกัด
4. ให้ Reproducible results

## 2. วิธีการทดลอง

2.1 ตัวอย่างคนปกติ (Normal control) จำนวน 6 คน Hb E traits จำนวน 8 คน และ  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E จำนวน 20 คน และ  $\beta^+$ -thalassemia/Hb E จำนวน 11 คน ซึ่งทุกคนมี  $\alpha$  Globin genotype แบบปกติ

2.2 การเตรียม Cellular RNA จะะเล็ดประมาณ 5 ml ใส่ในหลอดที่เคลือบด้วย EDTA จากนั้นทำการสกัด RNA โดยวิธีของ Chomczynski (12) หาข้อมูลทาง Hematological data โดยใช้ Automated cell culture และ วิธีที่ใช้ทั่วไป (Routine procedure) วิเคราะห์ Hb analysis โดยใช้ HPLC (13) ส่วนการหาค่าทาง Clinic จะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการเกิดโลหิตจาง ความถี่ของการถ่ายเลือด การเจริญเติบโตช้า และม้ามโต

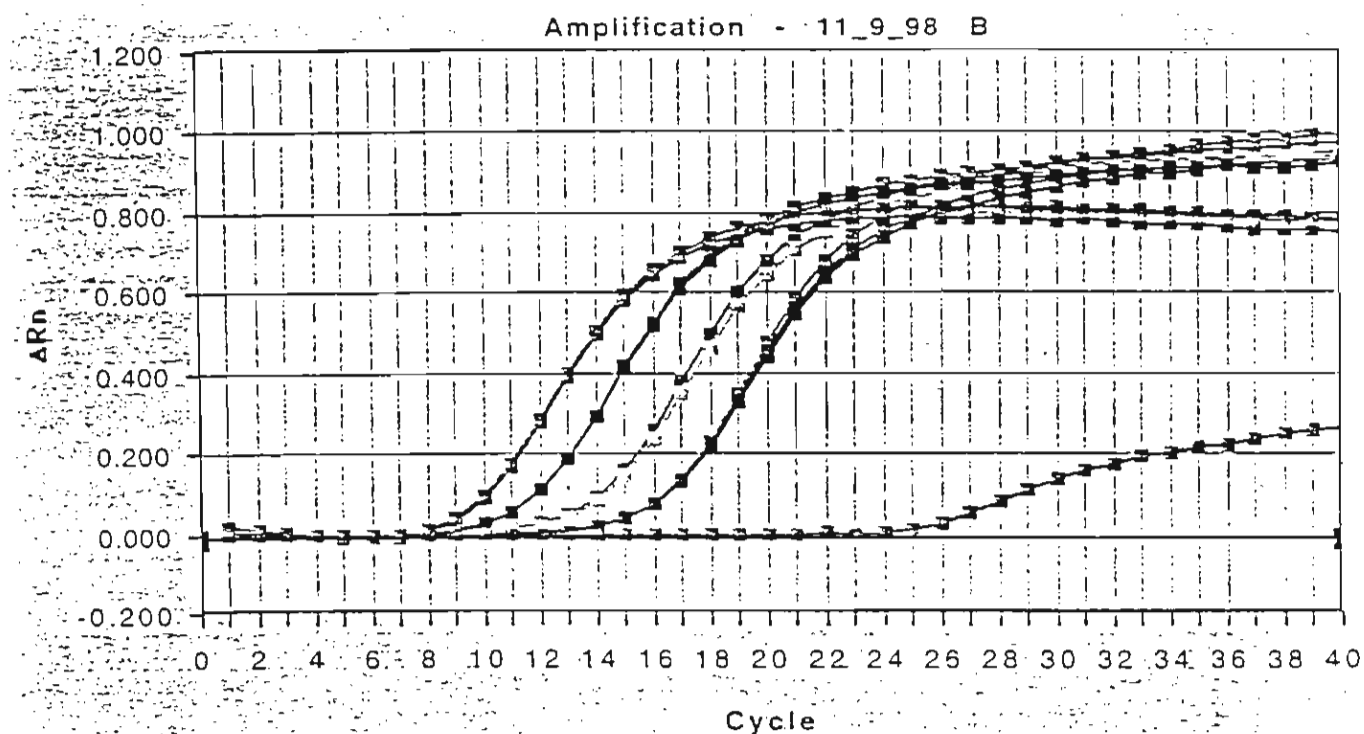
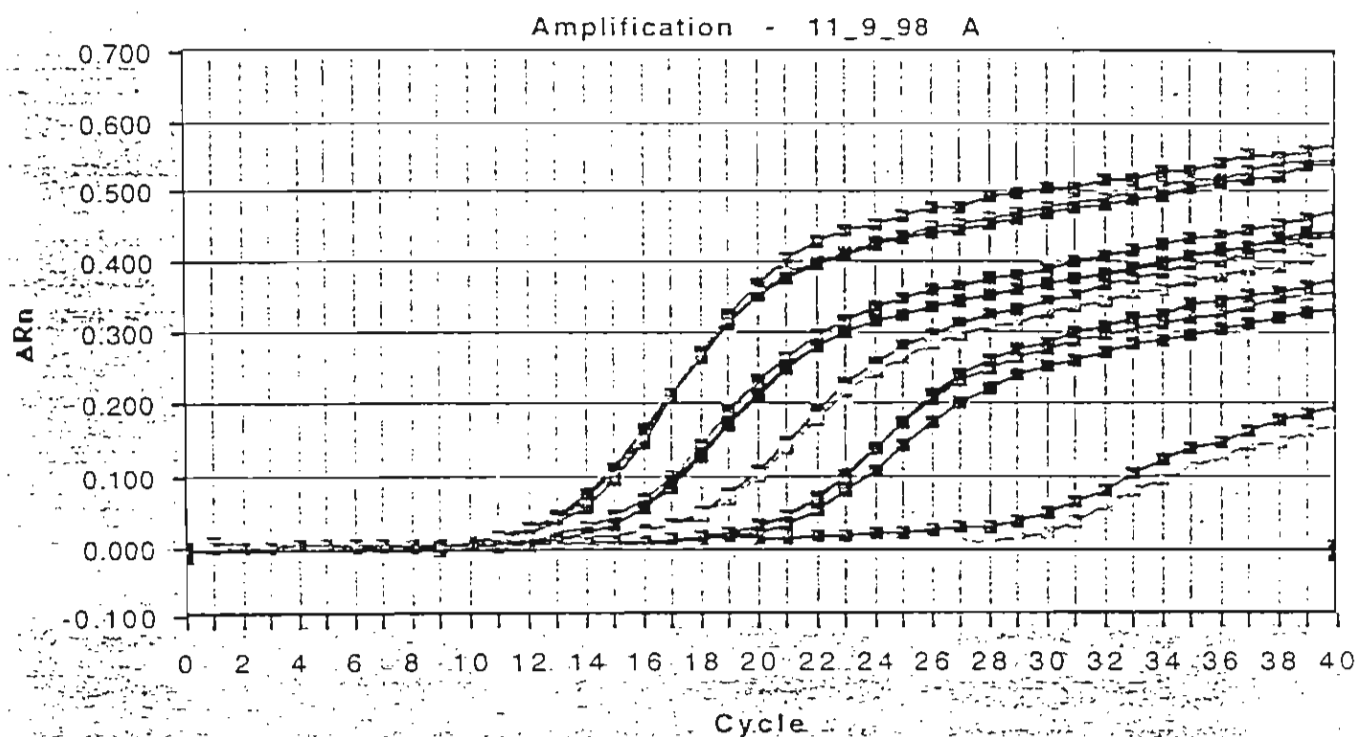
2.3 การสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับ  $\alpha$ - และ  $\beta$ -Globin primers รวมทั้ง  $\alpha$ - และ  $\beta$ -Globin probe โดย  $\alpha$ - Globin probe จะถูก Labeled ด้วย TET ทางด้าน 5' โดย Probes ทั้ง 2 ตัวจะถูก Lebeled ด้วย TAMRA (Quencher) ที่ปลาย 3'

2.4 One-step QC RT-PCR ในการทำการทดลองตัวอย่างจะถูกตรวจสอบ (Assay) ใน MicroAmp optical 96 wells reaction plate และทุกๆ ตัวอย่างจะทำการทดลองซ้ำสามครั้ง (Triplicate assay) RNA ที่ได้จาก Normal control จะถูกใช้เป็นตัวมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณ  $\alpha$ - และ  $\beta$ -Globin mRNA RT-PCR จะทำในปริมาตร 50  $\mu$ l โดยประกอบด้วย 1 x TaqMan buffer (500 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, และ 600 nM passive reference), 5.5 mM magnesium chloride, 300  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP, 600  $\mu$ M dUTP, 200 nM forward and reverse primers, 100 nM fluorescent-labelled probe, 0.025 U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold DNA polymerase in 20 mM Tris-HCl, pH 9.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 50% glycerol, และ 0.5% (w/v) Tween 20), 0.25 U/ml Multiscribe reverse transcriptase (100 U/ $\mu$ l of recombinant Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV) reverse transcriptase in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, และ 50% (v/v) glycerol) และ 0.4 U/ml RNase inhibitor. ในการทดลองจะใช้สภาวะที่เหมาะสม (Optimized RT-PCR) ดังนี้ RT-PCR ที่อุณหภูมิ 48°C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย AmpliTaq Gold activation ที่ 95°C 10 นาที แล้ว PCR amplification โดยใช้ Denaturation temperature ที่ 95°C 15 วินาที และ annealing/extension step ที่ 60°C 1 min เป็นจำนวน 40 รอบ โดยปฏิกิริยาทั้งหมดนี้ติดตามด้วยเครื่อง ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystem) โดยระบบนี้มีผู้นำไปใช้ในการศึกษา Quantitative PCR (14-16) และ RT-PCR (17) จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลอง

### 3. ผลการทดลอง

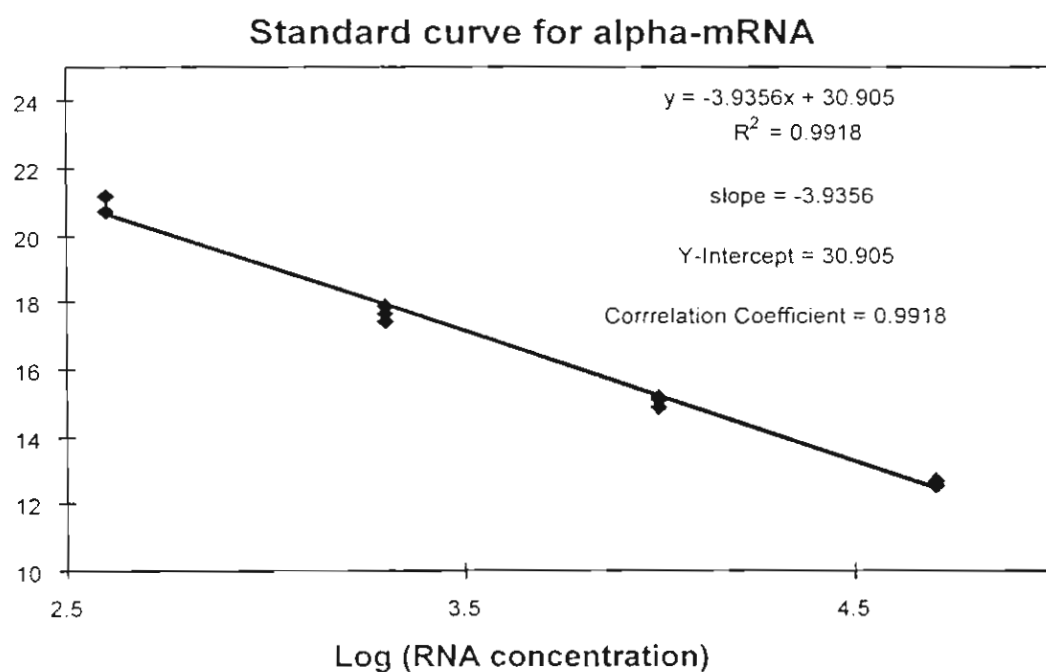
3.1 Amplification plot และ PCR detection จากการทำการทดลอง One step RT-PCR ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 1 ซึ่ง Plot ระหว่าง  $\Delta Rn$  (Reporter dye emission/Quencher dye emission) กับ Amplification cycles สำหรับ Serially diluted normal  $\alpha$ -Globin (รูปที่ 1A) และ  $\beta$ -Globin mRNA standard (รูปที่ 1B) พบว่า เมื่อปริมาณ RNA ลดลง Amplification plot จะเคลื่อนไปทางขวา แสดงว่าต้องใช้ Amplification cycles หลายๆ รอบ เพื่อให้ผ่าน Base line จากเส้น Base line นี้ ใช้ในการหา Threshold ได้ จากนั้นจะรายงานผลในรูป Cycle threshold ( $C_T$ ) ซึ่งเป็น Cycle ที่ Emission ของสารตัวอย่างผ่าน Threshold โดยเส้นมาตรฐานใน Normal control ที่ได้จากการ Plot ระหว่างค่า  $C_T$  และ Log (Starting number) ดังแสดงในรูปที่ 2 อย่างไรก็ตามพบว่าจากการทำการทดลองซ้ำสามครั้งนั้น  $C_T$  ที่ได้แต่ละครั้งจะมีค่าแตกต่างกันน้อยมาก จึงอาจจะสรุปได้ว่าวิธีการนี้เป็นวิธีการที่มี Highly reproducible ส่วน PCR products สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคทาง Electrophoresis (รูปที่ 3) พบว่าขนาดของ  $\alpha$ -Globin mRNA เป็น 71 bp และ ขนาดของ  $\beta$ -Globin mRNA เป็น 74 bp

3.2 Quantitative analysis ของ  $\alpha$ - และ  $\beta$ -Globin mRNA จากการศึกษาผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia/Hb E ที่มีการกลายพันธุ์ต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับ Normal control ผลการทดลองพบว่า  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios ของ 6 normal individuals มีค่าประมาณ 1.0-1.2 ส่วน Hb levels จะมีค่าเป็น 14.0 – 15.0 g/dl ในขณะที่ผู้ป่วย  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{-4bp}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{17}$ -thalassemia/Hb E) จำนวน 20 คน มีค่า  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios ประมาณ 2.4-9.4 และมีค่า Hb levels เป็น 5.3-9.1 g/dl นอกจากนั้น พบว่าในผู้ป่วย  $\beta^+$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{28}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{654}$ -thalassemia/Hb E, Hb E/Hb E ) จำนวน 11 คน จะมีค่า  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios อยู่ใน ช่วงระหว่าง 3.1-5.1 และมีค่า Hb levels เป็น 5.4-11.0 g/dl ส่วนใน Hb E traits จำนวน 8 คน จะมีค่า  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratio ประมาณ 1.7-2.6 และ Hb levels เป็น 12.0-13.5 g/dl และจากการ Plot ระหว่าง  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios และ Hb Levels ในผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia/Hb E แสดงในรูปที่ 4 สำหรับค่า  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios ในผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia/Hb E ชนิดต่างๆ เทียบกับ Normal control แสดงในรูปที่ 5 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่าเฉลี่ยของ  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios ใน  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{-4bp}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{17}$ -thalassemia/Hb E ) สูงกว่าในผู้ป่วย  $\beta^+$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{28}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{654}$ -thalassemia/Hb E, Hb E/Hb E ) ซึ่งสูงกว่าใน Normal controls และ Hb E traits.

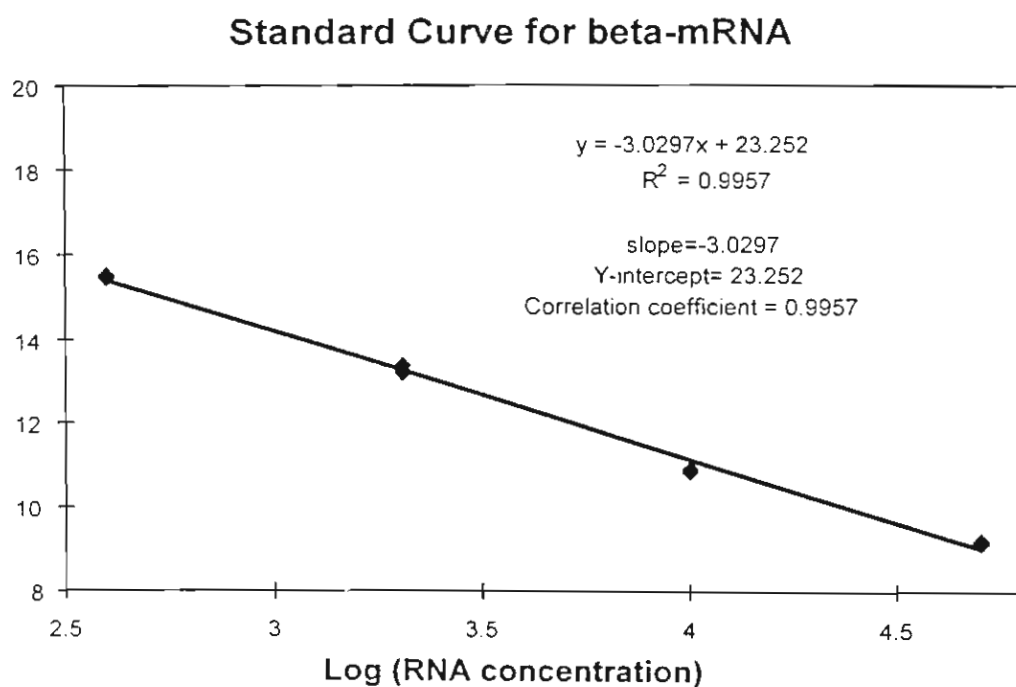


รูปที่ 1 แสดง Amplification plot ระหว่าง  $\Delta Rn$  (reporter dye emission/quencher dye emission) กับ Amplification cycles สำหรับ Serially diluted normal  $\alpha$ -and  $\beta$ -globin mRNA standard จากการทำ One-step RT-PCR ตามวิธีการทดลอง

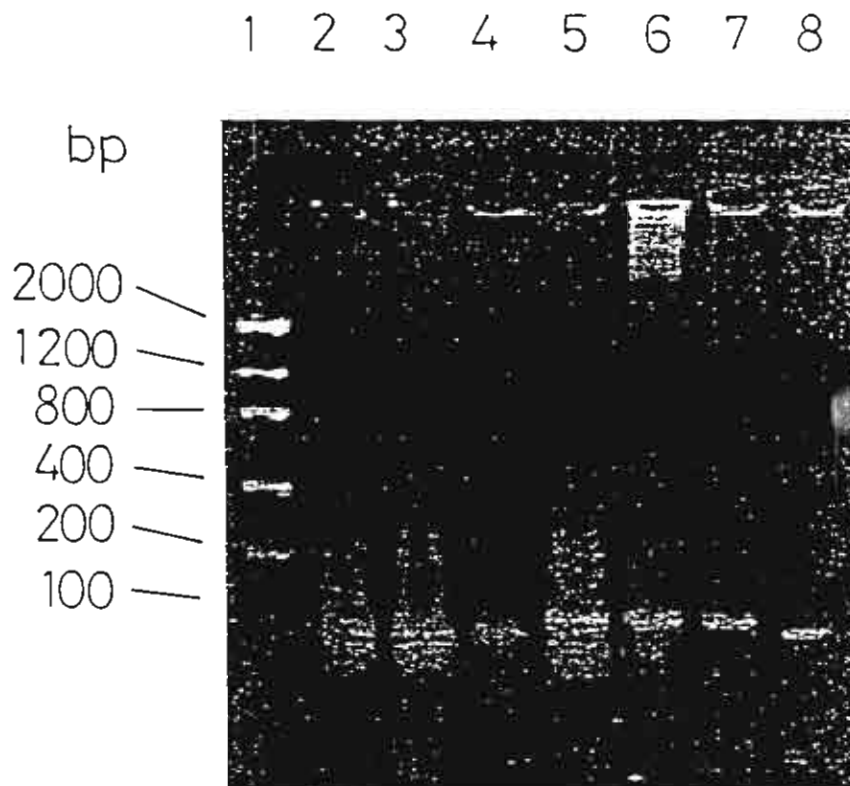
[A]



[B]



รูปที่ 2 แสดง Standard curve สำหรับ  $\alpha$ -และ  $\beta$ -mRNA โดย plot ระหว่าง threshold cycle (C<sub>T</sub>) กับ Log (Concentration) ซึ่งคำนวณจาก Amplification plot จากรูปที่ 1.



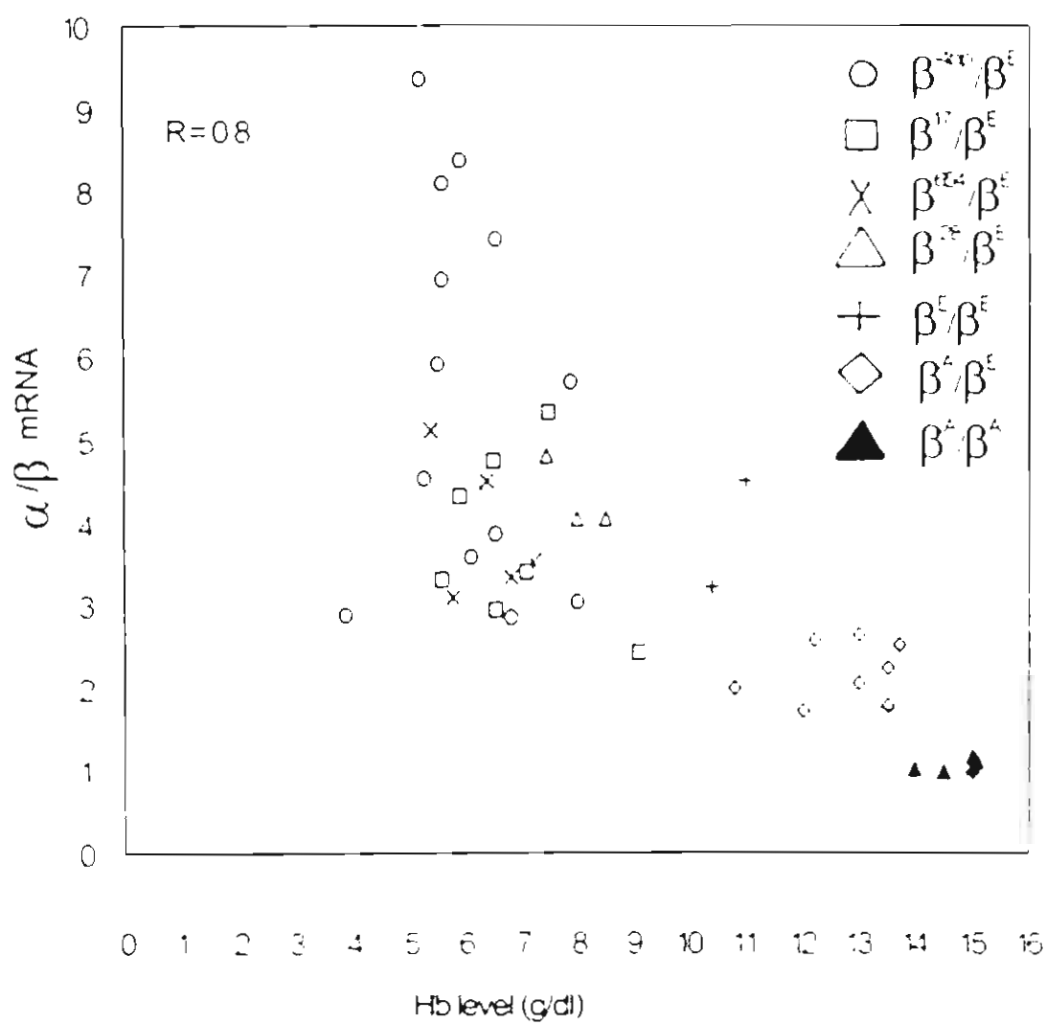
รูปที่ 3 แสดง PCR product ที่ได้จากการทำ One-step RT-PCR ตามวิธีการทดลองโดยใช้ MicroAmp Optical 96-well reaction plate และนำ Product ที่ได้ มาวิเคราะห์บน 2.0% Agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium bromide

เลนที่ 1 DNA Mass Ladder (Gibco BRL)

7  $\beta$ -Globin cDNA ขนาด 74 bp

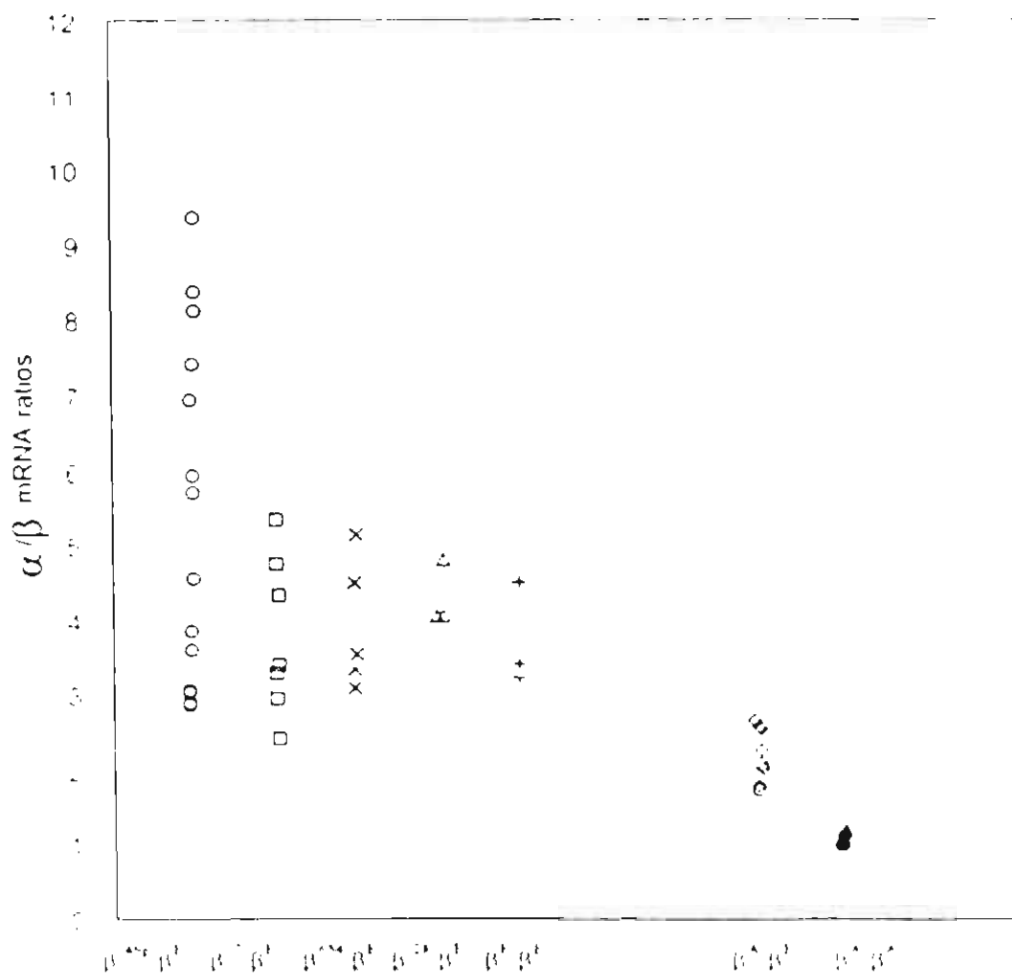
8  $\alpha$ -Globin cDNA ขนาด 71 bp

Comparison of Hb levels and  $\alpha/\beta$  mRNA in  
 $\beta$ -thalassemia/Hb E patients compared to normal  
 controls



រូបទី ៤ ឈម្របឈម្រប  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio ឆ្លងជាមួយកម្រិតអ៊ីម៉ូហ្គូលីន (g/dl) ក្នុងអ្នកជំងឺ  $\beta$ -thalassemia/Hb E គ្រប់គ្រាន់។

$\alpha/\beta$  mRNA in  $\beta$ -thalassemia/Hb E  
patients compared to normal control



รูปที่ 5 กราฟแสดง  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio ในผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia/Hb E เปรียบเทียบกับ Normal controls และ Hb E traits



#### 4. บทวิจารณ์

ในปัจจุบันมีความก้าวหน้าในการศึกษา Molecular biology ของเม็ดเลือดแดงและการพัฒนานวัตกรรมในการศึกษาหาปริมาณ mRNA ใน Reticulocyte ที่ได้จากตัวอย่างเลือดปริมาณน้อยๆ จากผู้ป่วย Hemoglobin disorder และ Normal control ถึงแม้ว่า เป็นวิธีที่มีประโยชน์หลายประการ (Powerful tool) แต่ก็ยังประสบกับปัญหาในการหาปริมาณ (14) กล่าวคือ มีการศึกษาหลายวิธีในการทำ Quantitative PCR และ RT-PCR แต่ไม่ได้วัด Initial target quantity โดยส่วนใหญ่จะทำการวัด End product ซึ่งไม่ใช่ปริมาณที่แท้จริง นอกจากนั้นการทำ PCR ยังต้องมี Post PCR manipulation เช่น Gel electrophoresis Southern hybridization เป็นต้น ซึ่งต้องใช้เวลาและแรงงานมาก และยังมีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนผู้ป่วยตัวอย่างในแต่ละครั้ง ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคใหม่คือ Real time RT-PCR detection system ในการหาปริมาณ mRNA ซึ่งมีข้อดีหลายประการอาทิเช่น ทำการทดลองในระบบปิดและไม่ต้องมีการทำ Post PCR processing จึงเป็นการลดการปนเปื้อนและเวลารวมทั้งแรงงาน ประการที่ สอง การวิเคราะห์จะใช้ค่า  $C_T$  ซึ่งเป็นค่าที่ได้จาก Real time ในช่วง Log phase ของการเกิดผลิตภัณฑ์จึงเป็นการลดปัญหาที่เกิดขึ้นในการใช้ค่าในช่วง Plateau stage ซึ่งจะให้ค่าไม่แน่นอนเนื่องจากอาจจะเกิดการขาด Substrate และ Enzyme เป็นต้น ประการที่ สาม ใน Real time สามารถใช้วิเคราะห์ครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง (High throughput) ส่วนประการสุดท้าย พบว่า Real time PCR มีความจำเพาะ (Specificity) สูงมากเพราะ Fluorescence จะถูกตรวจพบได้เมื่อมี Probe เข้าไปจับระหว่าง Primer ทั้ง 2 ตัว และ เมื่อเกิด PCR reaction เท่านั้น

ใน Compound heterozygote ของ  $\beta$ -thalassemia/Hb E พบว่ามีความแตกต่างในความรุนแรงของโรค ดังนั้นจึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มที่ได้พยายามศึกษาหาปริมาณที่แท้จริงของ mRNA ดังนั้น Real time PCR detection จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อดูว่าการที่สายโกลบินลดลง นั้นจะสอดคล้องกับการลดลงของ mRNA หรือไม่ จากการทดลองพบว่า  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio (2.4-9.4) ในผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia/Hb E ซึ่งสูงกว่าใน Normal controls (1.0-1.2) และ Hb E traits (1.7-2.6) แสดงว่ามีการลดลงของปริมาณ  $\beta$  Globin mRNA ในผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia/Hb E ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก  $\beta^{4bp}$ -thalassemia/Hb E และ  $\beta^{17}$ -thalassemia/Hb E ซึ่งเป็นการผ่าเหล่าที่ทำให้เกิด Premature termination ทำให้ได้ Truncated mRNA ซึ่งอาจจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ถ้าหากถูกเปลี่ยนเป็นโปรตีน ดังนั้นเซลล์จึงต้องกำจัด Unstable mRNA เหล่านี้โดย Pathway ที่เรียกว่า Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (18) ซึ่งเป็น Pathway ที่ใช้ในการทำลาย Premature termination mRNA อย่างไรก็ตาม การที่ผู้ป่วยที่มี Genotype เหมือนกันแต่มีค่า  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio ต่างกัน

อธิบายได้ว่าในผู้ป่วยแต่ละรายจะมี NMD activity ต่างกันออกไป สาเหตุอีกประการหนึ่งคือ อาจเนื่องมาจากอายุของเม็ดเลือดแดงที่ต่างกัน

ที่น่าสนใจคือ  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio ใน Normal control มีค่าประมาณ 1 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ Globin chain ที่สร้างออกมา คือ 1:1 อย่างไรก็ตามข้อมูลนี้ต่างไปจากการรายงานของ Smetanina *et al* (19) ซึ่งพบว่า  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio ของ Normal control มีค่าประมาณ 4.4 อธิบายได้ว่าเนื่องจากใช้เทคนิคที่ต่างกันคือ ใช้ Two-step RT PCR ตามด้วย การหาปริมาณ PCR products บน Non agarose denaturing และ Densitometric scanning ของ Auto radiogram ส่วนการใช้เทคนิคทาง Real time PCR มีการทดสอบความถูกต้องของเทคนิคนี้ โดยการหาปริมาณ DNA ใน Normal control ซึ่งมี  $\alpha:\beta$  Gene เป็น 4 : 2 และจากผลการหาปริมาณ DNA พบว่า  $\alpha/\beta$  Globin DNA ratio มีค่าประมาณ 1.9 ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันว่าเทคนิค Real time PCR เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในการหาปริมาณ mRNA

ส่วนการที่  $\alpha/\beta$  Globin mRNA ratio ของ Normal control มีค่าประมาณ 1 อาจเนื่องมาจากมี Correction of the message ที่ระดับ การถอดรหัส (Transcriptional level) ซึ่งนำไปสู่การสร้าง  $\alpha/\beta$  Globin chain 1:1

#### เอกสารอ้างอิง

1. Thein SL.  $\beta$ -thalassemia. In : clinical Haematology. The Haemoglobinopathies DR Higgs & DJ Weatherall (eds.). Bailliere Tindall, London. 1993; 6 : 151-75
2. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin. 1987; 11:65-88
3. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes. 3rd Ed, Blackwell, Oxford 1981.
4. Laig M, Sanguansermsri S, Wiangnon J, Hundrieser M, Pape M, Flatz G. The spectrum of  $\beta$ -thalassemia mutations in northern and northeastern Thailand. Hum Genet. 1989; 84: 47-50.
5. Thein SL, Winichagoon P, Hesketh C, Best S, Fucharoen S, Wasi P, Weatherall DJ. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia in Thailand: Amplication to prenatal diagnosis. Am J Hum Genet. 1990; 47 : 369-75.
6. Winichagoon P, Fucharoen S, Thonglairoam V, Tanapotiwirut V, Wasi P.  $\beta$ -thalassemia in Thailand. Ann N Y Acad Sci. 1990; 612:31-42.

7. Fucharoen G, Fucharoen Sp, Jetsrisuparb A, Fukumaki Y. Molecular Basis of Hb E/ $\beta$ -thalassemia and the origin of Hb E in northeast Thailand: identification of one novel mutation using amplified DNA from buffy coat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 170 : 698-704.
8. Saechan V, Panich V, Nopparatana C, Pornpatkul M, Laosombat V. The spectrum of  $\beta$ -thalassemia in Southern Thailand. Abstracts: First Annual Conference on Thalassemia. Prevention and Control in Thailand. Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat-Yai: 30 April 1993.
9. Takeshita K, Forget BG, Scarpa A, Benz EJ. Intranuclear defect in  $\beta$ -globin mRNA accumulation due to a premature translation termination codon. *Blood.* 1984; 64:13-22.
10. Stolle CA, Payne MS, Benz EJ. Equal stabilities of normal  $\beta$  globin and nontranslatable  $\beta$ -39 thalassemic transcripts in cell-free extracts. *Blood.* 1987; 70 : 293-300.
11. Baserga SJ, Benz EJ.  $\beta$ -globin nonsense mutation: deficient accumulation of mRNA occurs despite normal cytoplasmic stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 2935-2939.
12. Chomczynski, P.: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.*, 15: 532-537, 1993.
13. Winichagoon, P., Thonglairoam, V., Fucharoen, S., Wilairat, P., Fukumaki, Y., and Wasi, P.: Severity in  $\beta$ -thalassemia/Hb E syndrome: implication of genetic factors. *Br. J. Haematol.* 83: 633-639, 1993.
14. Raeymaekers, L.: A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Res.*, 5: 91-94, 1995.
15. Gelmini, S., Orlando, C., Sestini, R., Vona, G., Pinzani, P., Ruocco, L., and Pazzagli, M.: Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification. *Clin. Chem.*, 43: 752-758, 1997.
16. Witham, P. K., Yamashiro, C. T., Livak, K. J., Batt, C. A.: A PCR-based assay for the detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1347-1353, 1996.

17. Gibson, U. E. M., Held, C. A., and Williams, P. M.: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6: 995-1001. 1996.
18. Culbertson, M. R.: RNA surveillance; unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends in genet.*, 15: 74-80, 1999.
19. Smetanina, N. S., Gu, L. -H., Schiliro, G., Di Cataldo, A., Testa, R., Jakovlvska, Z., Efremov, G. D., and Huisman, T. H. J.: Relative levels of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -mRNA from patients with severe and intermediate  $\beta$ -thalassemia major. *Acta Haematologica.*, 97: 205-210, 1997.

### Output

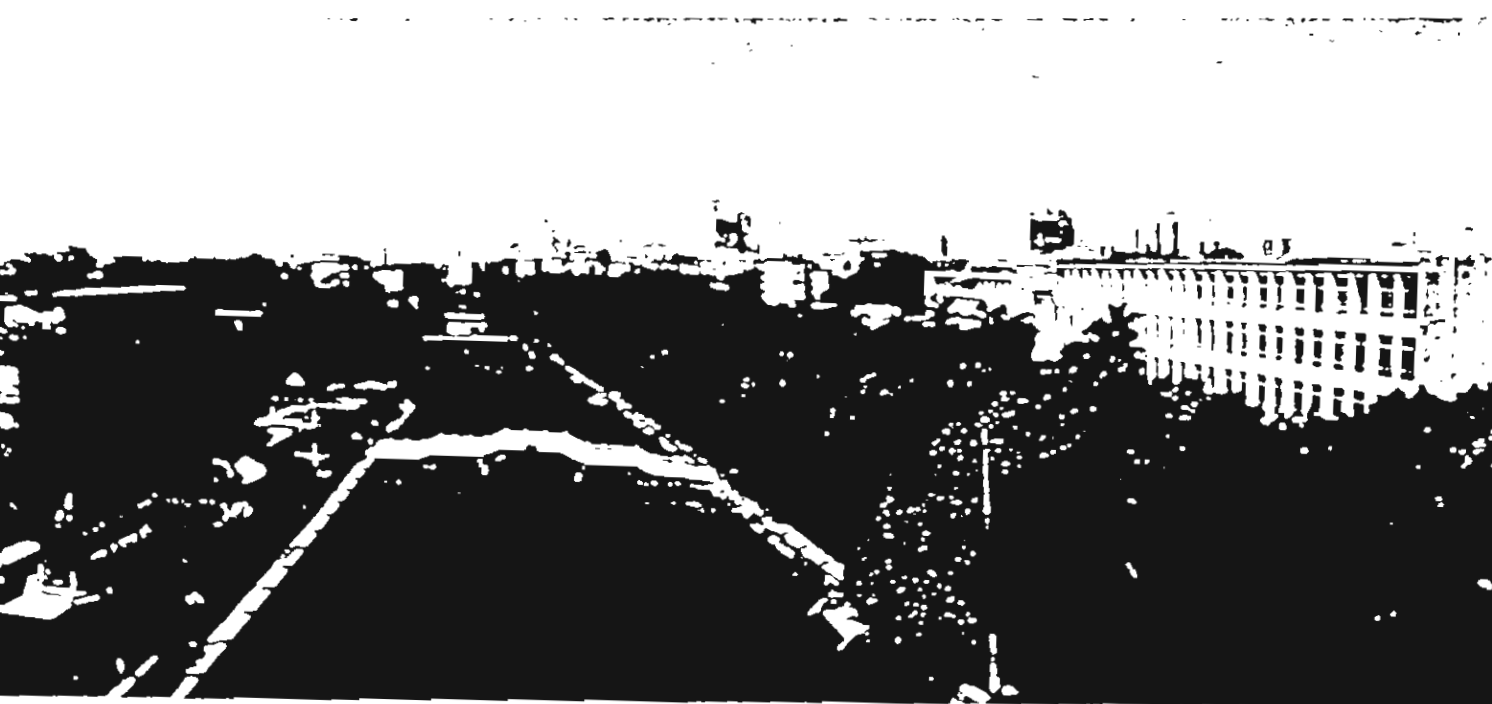
1. Watanapokasin, Y., Fucharoen, P., Wilairat, P., and Fucharoen, S.: Quantitation of  $\beta$ -globin mRNA in  $\beta$ -thalassemia/Hemoglobin E. 2<sup>nd</sup> International conference on thalassemia: Thalassemia in Millennium. Nanning, Guangxi, P.R. China, October 14 – 16, 1998.
2. Watanapokasin, Y., Winichagoon, P., Fucharoen, S., and Wilairat, P.: Analysis of mRNA in  $\beta$ -thalassemia/Hb E by real time PCR detection. The 7<sup>th</sup> international conference of thalassemia and the haemoglobinopathies, 31 May – 4 June, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand, 1999.
3. Winichagoon, P., Watanapokasin, Y., Wilairat, P., Ping Chen, Gui-fang Long, Siritanaratkul, N., Wasi, P., and Fucharoen, S.: Genotype-phenotype interaction in  $\beta$ -thalassemia: Experience in Thailand, 31 May – 4 June, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand, 1999.
4. Watanapokasin, Y., Winichagoon, P., Fucharoen, S., and Wilairat, P.: Application of real time PCR detection for mRNA quantitation in  $\beta$ -thalassemia/Hb E. *Hemoglobin*, 1999. (Paper submitted)

การตรวจพบ

ไม่พบ

15th International Conference on Harmonic Analysis in China  
Thiessenstrasse 10, Münster

## Program & Abstracts



October 15 - 16, 1998

Nanning Garden, The People's Republic of China

# ORGANIZERS

GUANGXI MEDICAL UNIVERSITY,  
NANNING, GUANGXI,  
P.R.CHINA

AND

THALASSEMIA RESEARCH CENTER,  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
FOR RESEARCH AND DEVELOPMENT,  
MAHIDOL UNIVERSITY,  
BANGKOK, THAILAND

## CO-SPONSORED BY

GOVERNMENT OF GUANGXI  
ZHUANG AUTONOMOUS REGION

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND

## QUANTITATION OF $\beta$ -GLOBIN mRNA IN $\beta$ -THALASSEMIA/HEMOGLOBIN E

*Yinwadee Watanapokasin, Pranee Winichagoon, Praporn Wilairit, Suthat Fucharoen*

*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinagarindwiroj University, Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand*

Thalassemia is a widespread genetic disease. By the year 2000, 7% of the world's population will carry a globin chain mutation.  $\beta$ -thalassemia is a very heterogeneous disorder due to the inactivation of the  $\beta$ -globin genes. Point mutation and small deletion or insertion in the nucleotide sequences are the main molecular defect responsible for most  $\beta$ -thalassemia. The inability to synthesize  $\beta$ -globin results in globin chain imbalance leading to the formation of excess unmatched  $\alpha$ -globin chains. It is, however, not clear whether the level of  $\beta$ -globin mRNA is also reduced. Using real time PCR detection system for quantitation of  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratio in different genotypes of Thai  $\beta$ -thalassemia subjects was performed. The  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios obtained in 8 subjects were as follows:  $\beta^0/\beta^0$  (1 case) 1.04, and  $\beta^{+100\text{del}}/\beta^0$  (4 case) 2.72-4.89,  $\beta^{28}/\beta^0$  (1 case) 3.74,  $\beta^{+56\text{del}}/\beta^0$  (1 case) 2.05 and  $\beta^A/\beta^{100}$  (1 case) 1.14. These results support the contention that the imbalance of protein synthesis in  $\beta$ -thalassemia reflects both impairment of translation and reduced  $\beta$ -globin mRNA content.

*This work is supported by The Thailand Research Fund and The National Research Council of Thailand.*

## CHARACTERIZATION OF THE IVS-I-110 (G $\rightarrow$ A) AND THE IVS-II-1 (G $\rightarrow$ A) $\beta$ -THALASSEMIA MUTATIONS IN THE JORDANIAN POPULATION

*M.F.Sadiq*

*A. Dept. of Biological Sciences, Yarmouk University, Irbid, Jordan*

The two most common mutations causing  $\beta$ -thalassemia in Jordan are the IVS-I-110 (G $\rightarrow$ A) and the IVS-II-1 (G $\rightarrow$ A). This study attempted to distinguish these two mutations in the Jordanian population. All members of three families with the IVS-I-110, two families with the IVS-II-1 and one family with both mutations were included in the study.

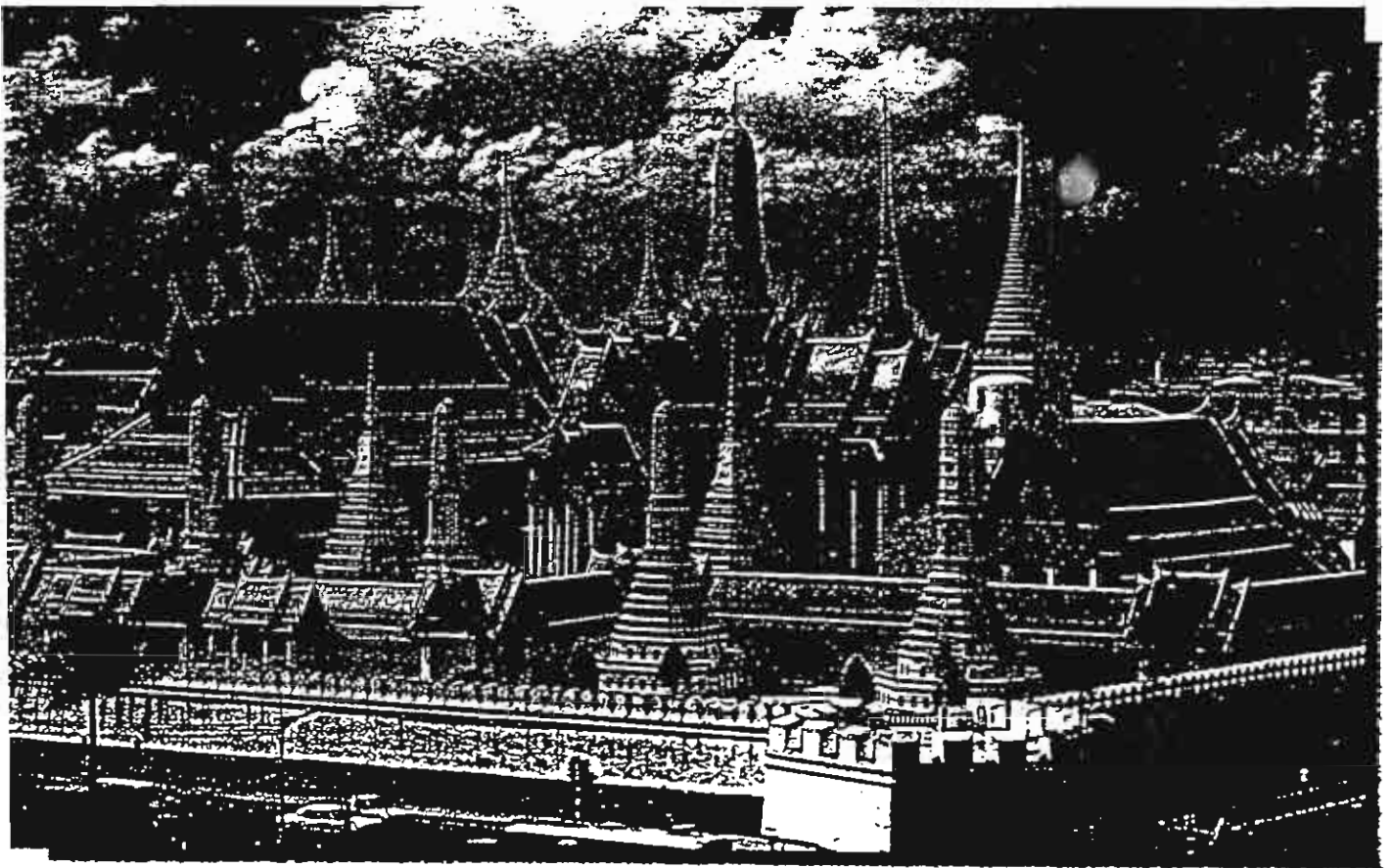
While blood films revealed no detectable differences between the two mutations, analysis of the hematological values in heterozygotes of both mutations showed that Hb A<sub>2</sub> and Hb F levels were significantly higher in IVS-II-1 heterozygotes ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.05$  respectively) compared to those of IVS-I-110 heterozygotes. Hb concentration, MCV and MCH on the other hand were found to be significantly lower in IVS-II-1 heterozygotes ( $p < 0.05$ ,  $P < 0.025$  and  $p < 0.01$  respectively) compared to those of IVS-I-110 heterozygote. Examination of the ultrastructure of red cells in





# **THE 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON THALASSAEMIA AND THE HAEMOGLOBINOPATHIES**

**THE 9th THALASSAEMIA PARENT AND THALASSAEMICS INTERNATIONAL CONFERENCE**



## **PROGRAM & ABSTRACT**

**31 MAY - 4 JUNE 1999**

**BANGKOK, THAILAND**



# THE 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON THALASSAEMIA AND THE HAEMOGLOBINOPATHIES

THE 9th THALASSAEMIA PARENT AND THALASSAEMICS INTERNATIONAL CONFERENCE



Ministry of Public Health



Thalassaemia Foundation of  
Thailand



National Blood Center, Thai  
Red Cross Society



The Society of Hematology  
of Thailand



Thalassaemia Research  
Center, Mahidol University



Thalassaemia International  
Federation



World Health Organization



ASEAN Thalassaemia Society

31 MAY - 4 JUNE 1999  
Bangkok, Thailand

ANALYSIS OF mRNA IN  $\beta$ -THALASSEMIA/Hb E BY REAL TIME PCR DETECTIONYuwadee Watanapokasin<sup>1</sup>, Pranee Winichagoon<sup>2</sup>, Suthat Fucharoen<sup>2</sup>, Prapon Wilairat<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakarinwirot University, <sup>2</sup>Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development,<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) has been widely used to quantitate different types of mRNA. However, the method still requires post-PCR manipulation which is labor- and time-intensive. Therefore, in this study, real time RT-PCR has been conducted to quantitate the  $\alpha/\beta$  globin mRNA in  $\beta$ -thalassemia/Hb E patients as compare to normal control. Since patients with  $\beta$ -thalassemia/Hb E show remarkable variability in severity, thus, the  $\alpha/\beta$  mRNA was determined. The result is shown in figure 1 supporting that the imbalanced protein synthesis in  $\beta$ -thalassemia reflects both impairment of reduced  $\beta$ -globin chain mRNA and translation.

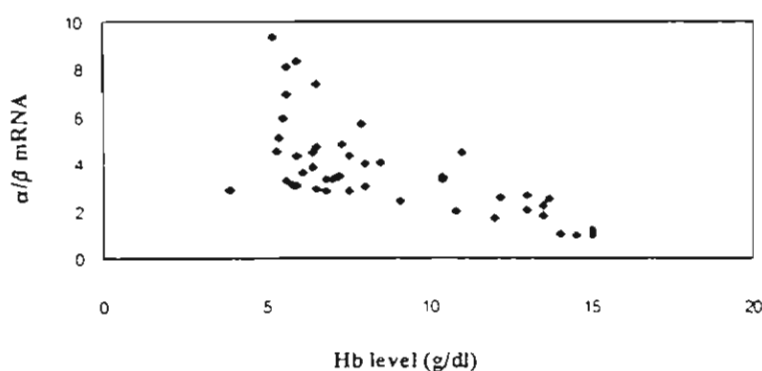


Fig.1 Comparison of Hb levels and  $\alpha/\beta$  mRNA in  $\beta$ -thalassemia/Hb E patients compared to normal controls

## GENOTYPE-PHENOTYPE INTERACTION IN $\beta$ -THALASSEMIA : EXPERIENCE IN THAILAND

*P. Winichagoon, Y. Watanapokasin, P. Wilairat, Ping Chen, Gui-fang Long, N. Siritanaratkul, P. Wasi, S. Fucharoen*

*Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Department of Biochemistry, Faculty of Science and Department of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Thailand and Hemoglobin Laboratory, Department of Pediatric, Guangxi University of Medical Sciences, Nanning, P.R. China*

Beta thalassemia is a very heterogeneous disorder due to variations in inactivation mechanism of the  $\beta$ -globin genes. Point mutations and small deletions or insertions in the nucleotide sequence are the main molecular defects responsible for most  $\beta$ -thalassemia. Homozygous  $\beta$ -thalassemia and  $\beta$ -thalassemia/Hb E are major  $\beta$ -thalassemic syndromes in S.E. Asia. In spite of seemingly identical genotypes, severity of  $\beta$ -thalassemic patients can vary greatly. Heterogeneity in the clinical manifestation of  $\beta$ -thalassemic diseases may occur from the nature of  $\beta$ -globin gene mutation,  $\alpha$ -thalassemia gene interaction and difference in the amount of Hb F production which is partly associated with a specific  $\beta$ -globin haplotype.

A total of 144  $\beta$ -thalassemia patients, 116 Thai and 28 Chinese from Nanning, were divided into mild, intermediate and severe cases according to clinical data and hemoglobin concentration. Clinical data included the age onset of presentation, age at first blood transfusion, requirement of blood transfusion, hepatosplenomegaly and growth development. Using these criteria 46 patients who had Hb  $\geq 7.5$  g/dl had a mild clinical symptom; 8 were  $\beta^+\beta^+$ -thalassemia or  $\beta^+$ -thalassemia/Hb E and 38 patients were  $\beta^0\beta^+$ -thalassemia or  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E, 17 of whom also had coinheritance of  $\alpha$ -thalassemia genes. Of the 43 patients with severe clinical symptom, 26 were  $\beta^0\beta^0$ -thalassemia, 5  $\beta^0\beta^+$ -thalassemia and 12  $\beta^0$ -thalassemia/HbE. Coinheritance of  $\alpha$ -thalassemia was found in 8 cases of  $\beta^0\beta^0$ -thalassemia but it did not ameliorate the severity of the disease (Table 1).

**Table 1** Summary of genetic factors that may determine the severity of  $\beta$ -thalassemia disease

Clinical symptom Genetic Factors	Homozygous $\beta$ -thalassemia			$\beta$ -Thalassemia/Hb E		
	Mild	Intermedia	Severe	Mild	Intermedia	Severe
Total subjects (No.)	16	11	31	30	44	12
$\beta^+$ -Thal/ $\beta^+$ -thal (Hb E)	4	0	0	4	0	0
$\beta^0$ -Thal/ $\beta^+$ -thal (Hb E)	12	4	5	26	44	12
$\beta^0$ -Thal/ $\beta^0$ -thal	0	7	26	0	0	0
$\alpha$ -Thal 1 trait	3	2	2	0	1	0
$\alpha$ -Thal 2/ $\alpha$ -thal 2	1	0	1	0	0	0
$\alpha$ -Thal 2 trait	2	2	3	8	0	0
Hb Constant Spring (CS)	0	1	0	4	2	0
Xmn I, --	11	7	26	2	8	4
Xmn I, ++	0	0	0	1	1	0
Xmn I, +-	4	4	5	25	32	8

# **Application of Real-time PCR detection for mRNA quantitation in $\beta$ -Thalassemia/Hb E**

**Y. Watanapokasin<sup>1</sup>, P. Winichagoon<sup>2</sup>, S. Fuchareon<sup>2</sup>, and P. Wilairat<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,  
Srinakarinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

<sup>2</sup>Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and  
Development, Mahidol University, Nakornpathom, Thailand

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science,  
Mahidol University, Bangkok 10110, Thailand

## ABSTRACT

$\beta$ -Thalassemia and hemoglobin (Hb) E patients, with seemingly identical genotype, have a remarkable variability in severity. As most of  $\beta$ -thalassemia mutations normally exhibit recessive inheritance resulting in a reduced or no  $\beta$ -globin chain synthesis. Therefore, many groups tried to quantify the amount of  $\beta$ -globin mRNA whether there is a correlation with the reduced  $\beta$ -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  $\alpha/\beta$  mRNA ratio (2.4-9.4) in  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E patients with chain termination mutation as compare to  $\beta^+$ -thalassemia/Hb E patients (3.1-5.1), 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  $\beta$ -thalassemia /Hb E patients. The difference in the  $\alpha/\beta$  mRNA ratio of patients with the same genotypes could be due to the difference in NMD activity in each individual.

## INTRODUCTION

Thalassemia and hemoglobinopathies are widespread recessive, inherited diseases. There are more than 1,000 mutations, including frameshifts, deletions,

insertions, etc have been detected in the human globin system, resulting in the synthesis of structurally abnormal proteins or in thalassemic types of disorders.  $\beta$ -Thalassemia, one of the most common single gene disorder, is characterized by abnormal  $\beta$ -globin gene function causing a decrease or absence of  $\beta$ -globin protein (1-3). More than 180 mutations affecting almost every known stage of  $\beta$ -globin gene expression result in a reduction ( $\beta^+$ ) or complete absence ( $\beta^0$ ) of  $\beta$ -globin chain synthesis from the affected alleles (1, 4). Such mutations may cause defects in transcription, RNA splicing and translation. In  $\beta^+$ -thalassemia,  $\beta$ -chain synthesis remains but at a markedly reduced rate and there is a correspondingly reduced level of  $\beta$ -globin mRNA in reticulocytes (5, 6). In  $\beta^0$ -thalassemia, no  $\beta$ -globin chains are synthesized. There are three main clinical phenotypes of  $\beta$ -thalassemia: thalassemia trait, thalassemia intermedia and thalassemia major (1). Thalassemia traits with one allele are clinically asymptomatic. Thalassemia intermedia is an ill-defined clinical term used to describe patients with phenotypes that are more severe than the asymptomatic thalassemia trait but milder than the transfusion-dependent thalassemia major. Most complications of  $\beta$ -thalassemia, including those related to extramedullary haemopoiesis including orthodontic abnormalities, fractures and spinal cord compression (7-9).

Hemoglobin E (Hb E) is the most common structural Hb variant among Southeast Asian populations. It is a  $\beta$ -globin variant resulting from the mutation at codon 26, G $\rightarrow$ A (Glu $\rightarrow$ Lys). The mutation in codon 26 of the  $\beta^E$ -globin gene can activate an adjacent cryptic splice site located at codon 24 to 27 giving rise to an alternative splicing which produces no  $\beta$ -globin chain whereas the normal spliced mRNA which contains the exon 1 mutation at codon 26 can produce  $\beta^E$ -globin (10). Hb E traits have minimal

hematologic manifestations except for microcytosis. Individuals who are homozygous for Hb E usually shown to be clinically normal, however, compound heterozygote for  $\beta$ -thalassemia and Hb E have a remarkable variability in severity and may have a severe  $\beta$ -thalassemia. The most severely affected individuals have an anemia similar to that of homozygous  $\beta$ -thalassemia disease. Despite apparently identical genotypes, severity of the patients can vary greatly, with Hb level ranging from 2.5 to 13.5 g/dl, in the steady state, has been shown in 803 patients with  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E (11). The difference in severity of  $\beta$ -thalassemia/Hb E has been affected by many confounding genetic factors. Mutations causing  $\beta$ -thalassemia can produce either severe (e.g. mutation in IVS-1 position 5, G $\rightarrow$ C) or mild clinical symptom (e.g. mutation at codon 26, Hb E) (10, 12). Co-inheritance of a gene for hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) or other determinants which elevate Hb F expression can alleviate the severity of  $\beta$ -thalassemia (13). In addition, co-inheritance of  $\alpha$ -thalassemia or Hb Constant Spring significantly ameliorates the severity of the disease (14). Recently, inheritance of a  $\beta$ -thalassemia chromosome with *Xmn* I cleavage site (+) at position -158 of the  $\gamma^G$ -globin gene was shown to be associated with milder anemia (15). Two copies of these alleles were necessary to produce significant clinical effect. Why should patients with the same genotypes have different phenotypes?

In this report, the one-step quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (QC RT-PCR) method has been used for quantitation of  $\beta$ -globin mRNA in both normal control and patients with  $\beta$ -thalassemia with many advantages: (1) as a one-step assay, it requires less labor, and sample handling, which minimizes the risk of sample-cross contamination; (2) no post PCR processing is necessary, quantitative results are



obtained in less time; and (3) the assay spans a large dynamic range, which eliminates the need for extensive sample dilution.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

Six normal adults, eight hemoglobin E traits, and twenty  $\beta^0$ Thalassemia/Hb E, eleven  $\beta^+$ Thalassemia/Hb E who have the normal  $\alpha$ -globin genotype were studied.

### **Isolation of Cellular RNA**

Five ml of blood samples were collected in vacutainers with EDTA as anticoagulant and transported in ice to the laboratory. RNA was extracted from the reticulocyte-enriched cells with the method of Chomczynski (16). Hematological data were determined with automated cell counter and other routine procedures. Hb analysis was performed during steady state by high performance liquid chromatographic procedure (15). Clinical assessment was based on severity of anemia, blood transfusion requirement and degree of growth impairment and spleen enlargement.

### **Oligonucleotides.**

Synthetic oligonucleotide primers and the fluorescently labeled oligonucleotide hybridization probes were synthesized by Perkin Elmer Applied Biosystem (Foster City,

CA, USA) (Table 1). The  $\alpha$ -globin probe was labeled with TET at 5' end, whereas the  $\beta$ -globin probe was labeled with FAM at 5' end. Both probes were labeled with the quencher fluor TAMRA at the 3' end. Primers and probes were designed using Oligo 4.0 software, following guideline suggested in Model 7700 Sequence Detection Instrument manual. ← Table

### One-step QC RT-PCR.

All samples were assayed in triplicate in a MicroAmp Optical 96-well reaction plate that were frosted to prevent light from reflecting. Tube caps were similar to MicroAmp Caps but specially designed to prevent light scattering (Perkin Elmer). Reagents for the one-step RT-PCR were from the TaqMan<sup>TM</sup> Gold RT-PCR Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) and the procedure recommended by the manufacturer. RNA from a normal sample was used as standard for quantitation of both  $\alpha$ - and  $\beta$ -mRNA. The assay was performed in a 50  $\mu$ l volume containing a mixture of 1 x TaqMan buffer (500 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, and 600 nM passive reference), 5.5 mM magnesium chloride, 300  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP, 600  $\mu$ M dUTP, 200 nM forward and reverse primers, 100 nM fluorescent-labelled probe, 0.025 U/ $\mu$ l AmpliTag Gold DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l AmpliTag Gold DNA polymerase in 20 mM Tris-HCl, pH 9.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 50% glycerol, and 0.5% (w/v) Tween 20), 0.25 U/ml Multiscribe reverse transcriptase (100 U/ $\mu$ l of recombinant Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV) reverse transcriptase in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, and 50% (v/v) glycerol) and 0.4

U/ml RNase inhibitor. The optimized RT-PCR reaction was performed at 48°C, 30 min followed by AmpliTaq Gold activation at 95°C, 10 min then PCR amplification with the denaturation temperature at 95°C, 15 sec and annealing/extension step at 60°C, 1 min for 40 cycles. RT-and cDNA amplification were carried out in an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystem). Reactions were programmed on a Power Macintosh G3 linked directly to the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. The probes used contain a fluorescent reporter dye, FAM or TET which is covalently linked to the 5' end of the probe, and the fluorescent quencher dye TAMRA is located near the 3' end. In addition, the probe contains a 3' blocking phosphate group to prevent probe extension during amplification (17). When the probe is intact, the reporter dyes fluorescent emission is suppressed due to the close proximity of the quencher dye. During PCR, if the target sequence is present, the probe anneals specifically between the forward and reverse primers. The 5'→3' nuclease activity of the Taq DNA polymerase cleaves the annealed probe between the reporter and quencher dyes, thereby releasing a measurable increase in fluorescence. The cleaved probe is then displaced, and polymerization of the strand continues (18-20). A detector monitors the increase in fluorescent emission in real time without further post-PCR analysis. Since the Taq DNA polymerase does not digest free probe and fluorescent emission requires that both primer and probe are complementary to the target sequence, nonspecific amplification is not detected (20). This type of sequence detection system has been used for both quantitative PCR (21-23) and RT-PCR (18) for specific gene targets. The amplification plots were obtained and the amount of mRNA was analyzed on the Macintosh computer. RT-PCR amplifications were also examined by agarose gel electrophoresis. After ethidium

bromide staining, bands were visible only at the expected molecular weights for the  $\alpha$ - and  $\beta$ - mRNA products.

## RESULTS

### Amplification plot and PCR Detection in Real Time

A PCR amplification of a 71 and 74 bp of  $\alpha$ - and  $\beta$ - globin mRNA using primers as shown in Table 1. During the extension phase of the PCR cycle, the 5'  $\rightarrow$  3' nucleolytic activity of the Taq DNA polymerase cleaves fluorescent hybridization probe releasing the reporter dye, TET or FAM, from the  $\alpha$ - or  $\beta$ -globin probe. The expected molecular weights for the  $\alpha$ - and  $\beta$ - mRNA products, 71 and 74 bp, respectively were also obtained after the RT-PCR reaction on an agarose gel electrophoresis (Fig. 1).

← Fig. 1

### Quantitative analysis of $\alpha$ - and $\beta$ - globin mRNA

Patients with different types of  $\beta$ -thalassemia/Hb E and normal samples were studied as mentioned in materials and methods. The  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios from 6 normal individuals are between 1.0-1.2, Hb levels are 14.0-15.0 g/dl, whereas 20 patients with  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{4bp}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{17}$ -thalassemia/Hb E) are ranging from 2.4-9.4, Hb levels are 5.3-9.1 g/dl. In addition, 11 patients with  $\beta^+$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{28}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{654}$ -thalassemia/Hb E, Hb E/Hb E), the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios are ranging from 3.1-5.1 and Hb levels are 5.4-11.0 g/dl. In 8 Hb E traits, the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratio is ranging from 1.7-2.6, Hb levels are from 12.0-13.5

g/dl. The  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios in different types of  $\beta$ -thalassemia/Hb E patients as compared to normal controls is shown in Fig. 2. The results indicated that the average  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios in  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{-4bp}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{17}$ -thalassemia/Hb E) were higher than in  $\beta^+$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{28}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{654}$ -thalassemia/Hb E, Hb E/Hb E) which were higher than that of normal controls and Hb E traits. Previous work by Smetanina et al. (24) showed that the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios of 5.2-10.5 in  $\beta$ -thalassemia intermedia due to combination of promoter mutations and a classical type of  $\beta$ -thalassemia confirming the mild suppression of  $\beta$ -mRNA synthesis. They also showed the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios in two subjects with a  $\beta^0$ -thalassemia heterozygosity of 8.3 and 7.3 were considerably higher than that for a normal control (4.4). In addition, Smetanina *et al* (25) also showed that premature termination of  $\beta$ -globin mRNA translation in codon 39 (C $\rightarrow$ T) nonsense mutation, results in mRNA degradation products in the cytoplasm with the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratio of approximately 8. They also showed that in IVS-I-110 (G $\rightarrow$ A) mutation containing base changes in an intervening sequence may produce a stable but non-functional mRNA with the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratio of 6.0-7.0. They suggested that the differences in the quantitative synthesis of  $\beta$ -mRNA, higher relative levels of the  $\beta$ -message are present in the patients with a milder phenotypes.

## DISCUSSION

Remarkable progress in molecular biology of the red cell, and methodology has been developed to evaluate the relative quantities of the different mRNAs in the

reticulocytes present in a few milliliter of blood from normal controls and patients with the various hemoglobin disorders. Although PCR has provided a powerful tool, it is imperative that it be used properly for quantitation (21). Many previous studies of quantitative PCR and RT-PCR described quantitation of the PCR product but did not measure the initial target quantity. In addition, these methods still require post-PCR manipulation including gel electrophoresis, Southern blot hybridization etc which is time- and labour-intensive, the sample throughput of some methods is limited.

In our study, the quantitation of  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratio in patients with  $\beta$ -thalassemia/Hb E were carried out using a new quantitative RT-PCR technique. The method is based on the use of fluorescent hybridization probes and ABI Prism 7700 Sequence Detection System. The real time PCR method offers many advantages. First of all, it is performed in a closed tube system and requires no post-PCR processing of sample. Therefore, PCR contamination is reduced as the PCR products can be analyzed and disposed off without opening the tubes. Secondly, this method supports the use of a normalization gene for quantitative RT-PCR controls. The  $C_T$  value, used for quantification, is performed in real time during log phase of amplicon accumulation. This circumvents many other problems associated with quantification in the plateau stage of a PCR amplification (21). Finally, the sample throughput will be increased as no post-PCR processing time, using 96-well format is highly compatible with automation technology.

High specificity can be obtained by using the real time RT-PCR. The Taq DNA polymerase enzyme requires that both probe and primers are complementary to the target sequence for nucleolytic cleavage and releasing of fluorescence emission. In addition, the use of Amplitaq Gold, which remains in an inactive state until a temperature well

above annealing is reached, minimizes primer dimer formation and amplification of non-specific products.

As compound heterozygotes for  $\beta$ -thalassemia/Hb E have a remarkable variability in severity. The most severely affected individuals have an anemia similar to that of homozygous  $\beta$ -thalassemia disease. However, variations in anemia, growth development, hepatosplenomegaly, and transfusion requirements are also observed. As it has been known that in  $\beta$ -thalassemia,  $\alpha/\beta$  globin chain synthesis ratio affects severity of the disease. Premature termination mRNA is unstable and the cells do not want truncated proteins which are toxic to the cells, but no systematic attempts have been made to look at mRNA stability among different genotypes of  $\beta$ -thalassemia/Hb E. Interestingly, determination by real time PCR detection method of the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratio in normal individuals are in the range between 1.0-1.2, which is different from the previous study of approximately 4.3 (24) determined by two-step RT-PCR followed by detection and quantitation of PCR products on a non-denaturing gel, and densitometric scanning of the autoradiograms. For mRNA ratio determination to be valid using an RT-PCR based method, all measurement must be taken during the exponential phase and the primer sets involved must have a very similar amplification efficiency. To confirm that our protocol fulfilled these requirements, the  $\alpha/\beta$  globin DNA ratio was determined using the technique of real time PCR detection in normal sample and the results show that the ratio is  $\sim 1.9$  (data not shown) which correlates with the  $\alpha/\beta$  globin gene ratio of 2. As we know that individuals without globin gene abnormalities have 2  $\alpha$ -globin genes for every  $\beta$ -globin gene. Thus the technique is reliable, not an artifact. The ratio in normal individuals are in the range between 1.0-1.2 could be due to a correction of the message

at the transcriptional step, having the  $\beta$  globin gene as the rate limiting step, finally leading to an equal  $\alpha/\beta$  globin chain synthesis.

Mutations that cause deletion or frameshift and premature termination,  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E ( $\beta^{-4bp}$ -thalassemia/Hb E,  $\beta^{17}$ -thalassemia/Hb E), the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios in 20 patients show the increase in  $\alpha/\beta$  mRNA ratio (2.4-9.3) as compare to  $\beta^+$ -thalassemia/Hb E patients (3.1-5.1), normal controls (1.0-1.2) and Hb E traits (1.7-2.6). The increase in the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios could be partly due to premature (truncated) termination which leads to unstable mRNA that can not be translated along their full length are rapidly degraded. This helps in reducing the accumulation of rouge proteins that might be deleterious. The pathway that accelerated mRNA decay is referred to as nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (26). The difference in the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios among  $\beta^0$ -thalassemia/Hb E patients with same genotypes could be due to the difference in the activities of NMD pathway in each individual and the age of the red blood cells in the circulation. As the proportion of mRNA decreases with erythroid maturation (27). The results correlate with the work by Smetanina *et al* (24) showed that the the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratios in two subjects with a  $\beta^0$ -thalassemia heterozygosity of 8.3 and 7.3 were considerably higher than that for a normal control (4.4) confirming the mild suppression of  $\beta$  mRNA synthesis. The work by Smetanina *et al* (25) also indicated that the differences in the quantitative synthesis of  $\beta$ -mRNA, higher relative levels of the  $\beta$ -message are present in the patients with milder phenotypes.



## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by The Thailand Research Fund and The National Research Council of Thailand.

## REFERENCES

1. Weatherall, D. J. and Clegg, J. B.: *The Thalassemia Syndromes*, 3<sup>rd</sup> edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1981.
2. Thein, S. L.: Dominant  $\beta$ -thalassemia: Molecular basis and pathophysiology. *Br. J. Hematol.*, 19: 213-236, 1992.
3. Kazazian, H. H., and Boehm, C. D.: Review: molecular basis and prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia. *Blood*, 72: 1107-1116, 1998.
4. Baysal, E., and Carver, M. F. H.: The  $\beta$ - and  $\delta$ - thalassemia respiratory. *Hemoglobin*, 19: 213-236, 1995.
5. Housman, D., Forget, B. G., Skoultschi, A., and Benz, E. J. Jr.: Quantitative deficiency of chain-specific globin mRNA in the thalassemia syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 1809-1813, 1973.
6. Kacian, D. L., Gambino, R., Dow, L. W., Grossbard, E., Natta, C., Ramirez, F., Spiegelman, S., Marks, P. A. and Bank, A.: Decreased globin messenger RNA in thalassemia detected by molecular hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 1886-1890, 1973.
7. Konstantopoulos, K., Vagiopoulos, G., Kantouni, R., Lymperi, S., Patriarcheas, G., Georgakkopoulos, D., and Fessas, P. A.: Case report of spinal cord compression by extramedullary haemopoiesis in a thalassemic patient: a putative role for hydroxyurea? *Haematologica*, 77: 352-354, 1992.

8. Mancuso, P., Zingale, A., Basile, L., Chiaramonte, I., and Tropea, R.: Cauda equina compression syndrome in a patient affected by thalassemia intermedia: complete regression with blood transfusion therapy. *Child's nervous system*, 9: 440-441, 1993.
9. Anselm, C. W., Tai, K. S., Wong, V., Peh, W. C. G., and Lau, Y. L.: Hypertransfusion for spinal cord compression secondary to extramedullary hematopoiesis. *Pediatric Hematol. Oncol.*, 13: 89-94, 1996.
10. Orkin, S. H., Kazazian, H. H. Jr., Antonaraki, S. E., Ostrer, H., Goff, S. C., and Sexton, J. P.: Abnormal RNA processing due to the exon mutation of the  $\beta^E$ -globin gene. *Nature*, 300: 768-769, 1982.
11. Fucharoen, S., winichagoon, P., Pootrakul, P., Piankijagum, A., and Wasi, P.: *Birth Defects*, 23 (5A): 241-248, 1988.
12. Kazazian, H. H. Jr., Antonaraki, S. E., et al.: Molecular characterization of severe  $\beta$ -thalassemia mutations in Asian Indians. *EMBO J.*, 3: 593-596, 1984.
13. Capellini, M. D., Fiorelli, G., and Bernini, L. F.: Interaction between homozygous  $\beta$ -thalassemia and the Swiss type of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Br. J. Haematol.*, 48: 561-572, 1981.
14. Winichagoon, P., Fucharoen, S., Weatherall, D. J., and Wasi, P.: Concomitant inheritance of  $\alpha$ -thalassemia in  $\beta$ -thalassemia/Hb E. *Am. J. Haematol.*, 20: 217-222, 1985.
15. Winichagoon, P., Thonglairoam, V., Fucharoen, S., Wilairat, P., Fukumaki, Y., and Wasi, P.: Severity in  $\beta$ -thalassemia/Hb E syndrome: implication of genetic factors. *Br. J. Haematol.* 83: 633-639, 1993.

16. Chomczynski, P.: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.*, 15: 532-537, 1993.
17. Perkin-Elmer. TaqMan probe design, synthesis and application. Norwalk, CT, 1995.
18. Gibson, U. E. M., Held, C. A., and Williams, P. M.: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6: 995-1001. 1996.
19. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6: 986-994, 1996.
20. Perkin-Elmer. TaqMan PCR reagent kit protocol. Norwalk, CT, 1996.
21. Heneine, W., Yamamoto, S., Switzer, W. M., Spira, T. J., and Folks, R. M.: Detection of reverse transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Disease.*, 171: 1210-1216, 1995.
22. Gelmini, S., Orlando, C., Sestini, R., Vona, G., Pinzani, P., Ruocco, L., and Pazzagli, M.: Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification. *Clin. Chem.*, 43: 752-758, 1997.
23. Witham, P. K., Yamashiro, C. T., Livak, K. J., Batt, C. A.: A PCR-based assay for the detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1347-1353, 1996.
- Panet, A., Baltimore, D., and Hanafusa, T.: Quantitation of avian RNA tumor virus reverse transcriptase by radioimmunoassay. *J. Virol.*, 16: 146-152, 1975.

24. Smetanina, N. S., Gu, L. -H., Schiliro, G., Di Cataldo, A., Testa, R., Jakovljaska, Z., Efremov, G. D., and Huisman, T. H. J.: Relative levels of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -mRNA from patients with severe and intermediate  $\beta$ -thalassemia major. *Acta Haematologica.*, 97: 205-210, 1997.
25. Smetanina, N. S., Molchanova, T. P., and Huisman, T. H. J.: Analysis of mRNA from red cells of patients with thalassemia and hemoglobin variants. *Hemoglobin*, 21: 437-467, 1997.
26. Culbertson, M. R.: RNA surveillance; unforeseen consequences for gene expression. inherited genetic disorders and cancer. *Trends in genet.*, 15: 74-80, 1999.
27. Ho, P. J., Hall, G. W., Watt, S., West, N. C., Wood, W. G., and Theins, S. L.: Unusually severe heterozygous  $\beta$ -thalassemia: evidence for an interacting gene affecting globin translation. *Blood*, 92: 3428-3435.

**Table 1.** Primer and probes sequences of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')	Location
<b><math>\alpha</math>-globin gene</b>		
$\alpha$ -globinF primer	5'GAGGCCTGGAGGATGTTC 3'	95-114
$\alpha$ -globinR primer	5'CGTGGCTCAGGTCGAAGTG 3'	165-183
$\alpha$ -globin probe	5'TGTCCTTCCCCACCACCAAGACCTACT3'	115-141
<b><math>\beta</math>-globin gene</b>		
$\beta$ -globinF primer	5'GGGATCTGTCCACTCCTGATG 3'	190-210
$\beta$ -globinR primer	5'GGCACCGAGCACTTTCTTG 3'	263-281
$\beta$ -globin probe	5'TGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCA3'	217-241

**Fig. 1.** The  $\alpha$ - and  $\beta$ - globin cDNA obtained from one-step RT-PCR (Real time PCR detection) of normal  $\alpha$ - and  $\beta$ -mRNA using primers and probes as listed in Table 1. Ethidium bromide stained 2.0% agarose gel was visualized. The lanes are represented by lane 1: DNA Mass Ladder (Gibco BRL), lane 7:  $\beta$ - globin cDNA (74 bp), lane 8:  $\alpha$ - globin cDNA (71 bp)

**Fig. 2.** Comparison of the  $\alpha/\beta$  globin mRNA ratio in subjects with  $\beta^{-4bp}/\beta^E$ ,  $\beta^{17}/\beta^E$ ,  $\beta^{654}/\beta^E$ ,  $\beta^{28}/\beta^E$  and  $\beta^E/\beta^E$  as compare to normal control ( $\beta^A/\beta^A$ ) and Hb E traits ( $\beta^A/\beta^E$ ). The one-step RT-PCR (Real time PCR detection) was carried out as mentioned in methods using  $\alpha$ - and  $\beta$ -primers and probes as listed in Table 1. The optimized condition used was 48°C, 30 min. for reverse transcription followed by Amplitaq Gold activation at 95°C, 10 min. then PCR amplification with the denaturation temperature at 95°C, 15 min. and annealing/extension step at 60°C, 1 min for 40 cycles

(Legend)

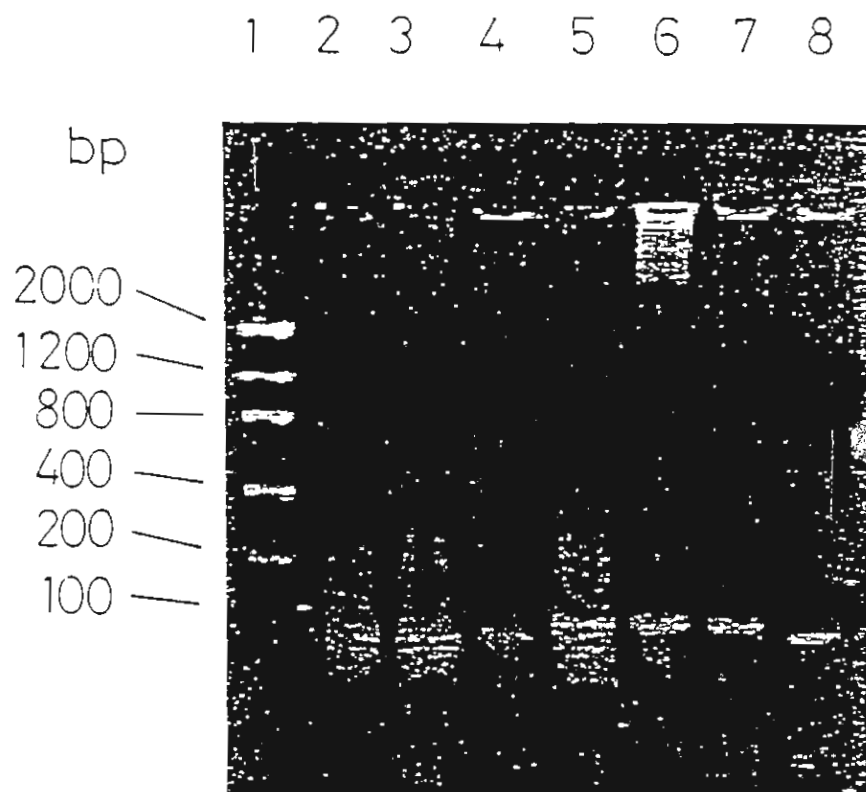


Fig. 1

$\alpha/\beta$  mRNA in  $\beta$ -thalassemia/Hb E  
patients compared to normal control

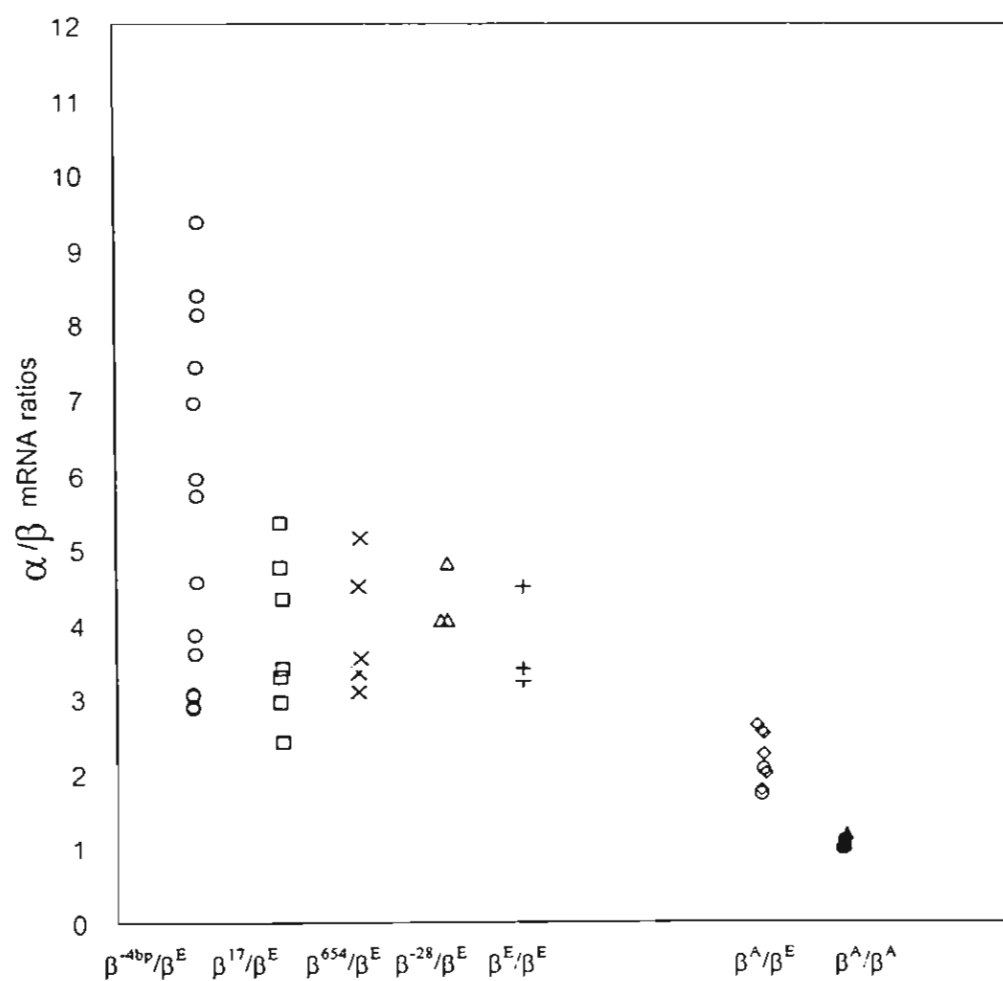


Fig. 2