



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของอัลฟาธาลัสซีเมีย
ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สปริง และบีตาธาลัสซีเมีย

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิพรรณ กิจเจริญ

กุมภาพันธ์ 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของอัลฟาธาลัสซีเมีย
ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สปริง และบีตาธาลัสซีเมีย

คณะผู้วิจัย

- ผศ.ดร. สุทธิพรรณ กิจเจริญ
- ศ.ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์
(นักวิจัยที่ปรึกษา)

สังกัด

ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ชุดโครงการ ทนวิจัยหลังปริญญาเอก

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดีเยี่ยมของ ศาสตราจารย์ ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์ นักวิจัยที่ปรึกษา (Mentor) ซึ่งเป็นผู้ที่ให้โอกาส คำแนะนำ และคำปรึกษา เป็นอย่างดีในระหว่างดำเนินการวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขต้นฉบับ (manuscript) เพื่อการตีพิมพ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ พญ. อรุณี เจตศรีสุภาพ ในการอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือด และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและครอบครัว

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณ พุเจริญ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และรองศาสตราจารย์ กุลนภา พุเจริญ ในการให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆ ระหว่างการทำวิจัย รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็น และการอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และขอขอบคุณ นักศึกษา บุคลากร และคณาจารย์ทุกท่าน ที่ปฏิบัติงานอยู่ที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางแพทย์ ในการมีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ และหน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าของตัวอย่างเลือดทุกราย ที่ได้นำเลือดส่วนที่เหลือจากการตรวจตามแพทย์สั่งของท่านมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยโครงการนี้ จนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี และหวังว่าจะได้รับการพิจารณาให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในโอกาสต่อไป

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิพรรณ กิจเจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
บทนำ	3
วิธีการศึกษา	4
ผลการศึกษา	8
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	14
เอกสารอ้างอิง	16
OUTPUT ที่ได้จากโครงการ	19
APPENDIX	20

รหัสโครงการ : PDF44/2543

ชื่อโครงการ : การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของอัลฟาธาลัสซีเมีย
ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สปริง และบีตาธาลัสซีเมีย

ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร. สุทธิพรพรณ (ประสาธแก้ว) กิจเจริญ

ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address : sutpra@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2543 – 30 มิถุนายน 2545

บทคัดย่อ :

ความไม่สมดุลระหว่าง α -globin และ β -globin เป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดความรุนแรงของโรคธาลัสซีเมีย การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาความไม่สมดุลของ α -globin และ β -globin ในโรคธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ โดยการตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของอัลฟาธาลัสซีเมียและบีตาธาลัสซีเมีย ด้วยเทคนิค multiplex one-step real-time RT-PCR ในตัวอย่างจำนวน 121 ราย แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ คนปกติ 14 ราย อัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ต่างๆ 75 ราย และบีตาธาลัสซีเมียที่มีและไม่มีอัลฟาธาลัสซีเมียร่วม 32 ราย ผลการศึกษาพบว่า คนปกติมีค่ามัธยฐาน (สูงสุด-ต่ำสุด) ของ α/β globin mRNA เท่ากับ 1.29 (0.90-2.91) ในอัลฟาธาลัสซีเมียอัตราส่วนนี้จะลดลงขึ้นกับจำนวนยีนอัลฟาโกลบินปกติ และในบีตาธาลัสซีเมียอัตราส่วนจะสูงกว่าคนปกติ คือ โรคบีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีมีอัตราส่วนสูงที่สุด ตามด้วยพาหะบีตาศูนย์ธาลัสซีเมีย และพาหะบีตาเบต้าธาลัสซีเมีย ในตัวอย่างกลุ่มนี้จะเห็นว่าอัตราส่วนของ α/β globin mRNA จะลดลงตามความรุนแรงของบีตาธาลัสซีเมียที่ลดลง เมื่อบีตาธาลัสซีเมียพบร่วมกับอัลฟาธาลัสซีเมีย มีผลทำให้อัตราส่วนของ α/β globin mRNA เข้าใกล้ค่าของคนปกติมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคบีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีที่มีอัลฟาธาลัสซีเมียร่วม จะมีอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ลดลงอย่างชัดเจน และมีความรุนแรงของภาวะเลือดจางที่ลดลงด้วย ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA บ่งบอกถึงความไม่สมดุลระหว่าง α -globin และ β -globin และสอดคล้องกับความรุนแรงของโรคธาลัสซีเมีย

คำหลัก : ธาลัสซีเมีย อัตราส่วนของ α/β globin mRNA เทคนิค quantitative RT-PCR

Project Code : PDF44/2543

Project Title : Measurement of α/β globin mRNA ratios in α -thalassemia, hemoglobin Constant Spring and β -thalassemia

Investigator : Asist.Prof. Dr. Suttiphan (Prasartkaew) Kitcharoen

Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences,
Khon Kaen University

E-mail Address : sutpra@kku.ac.th

Project Period : July 1, 2000 – 30 June, 2002

Abstract

Imbalance in α/β -globin chains is an important determinant of thalassemia disease severity. This study examined the relationship between α/β -globin mRNA ratio and disease severity in various thalassemia genotypes. α - and β -globin mRNA contents of red blood cells of 75 α - and 32 β -thalassemia subjects (5 with β^0 -thalassemia/Hb E) and 14 normal controls were measured using multiplex quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The α/β -globin mRNA ratio of each sample was calculated based on the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. A decrease of α/β -globin mRNA ratios in α -thalassemia subjects compared to normal controls correlated with the numbers of defective α -globin genes, whereas an increase of the ratios was observed in β -thalassemia. Subjects with β^0 -thalassemia/Hb E disease had the highest α/β -globin mRNA ratio, followed by β^0 -thalassemia trait and then β^+ -thalassemia trait, which correlated with decrease in severity of anemia. Coinheritance of α -thalassemia in β^0 -thalassemia/Hb E resulted in a more balanced α/β -globin mRNA ratio and an amelioration of the anemia. This study indicates that imbalance in globin gene expression, the major factor affecting clinical severity of thalassemia, could be demonstrated by measuring α/β -globin mRNA ratio, which was conveniently and accurately determined by qRT-PCR. In α -thalassemia, α/β -globin mRNA ratio correlated with the number of functional α -globin genes present, whereas in β -thalassemia the ratio provided a good indicator of disease severity.

Keywords: thalassemia, imbalance of globin chain, α/β globin mRNA ratio, qRT-PCR

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคเลือดจางที่ถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบิน (globin gene) ทำให้มีการสังเคราะห์สายโกลบินได้น้อยลงหรือไม่ได้เลย [1] ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของธาลัสซีเมียสูงมาก โดยพบอุบัติการณ์ของอัลฟาธาลัสซีเมีย 20-30% และบีตาธาลัสซีเมีย 3-9% [2] นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของยีนอัลฟาโกลบินและบีตาโกลบิน ที่ทำให้เกิดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติอีกหลายชนิด ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ ฮีโมโกลบินอี (hemoglobin E; Hb E) และฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สปริง (Hb Constant Spring; Hb CS) Hb E เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินตรงตำแหน่งโคดอนที่ 26 เปลี่ยนจาก GAG เป็น AAG ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์โดยเฉลี่ยของ Hb E 13% และพบอุบัติการณ์สูงถึง 50% ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ [3-4] Hb CS เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนอัลฟาสองตรงตำแหน่งโคดอนยู่ติเปลี่ยนจาก TAA เป็น CAA พบอุบัติการณ์ประมาณ 1-8% [3,5] นอกจาก Hb CS แล้ว ปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบ Hb Pakse' (PS) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนอัลฟาสองเช่นเดียวกัน แต่โคดอนยู่ติเปลี่ยนจาก TAA เป็น TAT [6-7]

การปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนโกลบินที่ผิดปกติเหล่านี้ ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียที่ซับซ้อน และมีอาการรุนแรงแตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่ไม่มีอาการซีด ซีดเล็กน้อย ซีดปานกลาง ไปจนถึงกลุ่มที่มีอาการซีดมากและต้องได้รับเลือดเป็นประจำ และอาการที่รุนแรงมากที่สุด คือ เสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือแรกคลอด อาการที่รุนแรงแตกต่างกันนี้ ขึ้นกับไม่สมดุลระหว่างสายอัลฟาโกลบินและสายที่ไม่ใช่อัลฟาโกลบิน (บีตาโกลบิน และแกมมาโกลบิน)[1,8] ความไม่สมดุลระหว่างสายอัลฟาโกลบินและสายที่ไม่ใช่อัลฟาโกลบินนี้ สามารถตรวจวัดได้โดยตรงด้วยการวัดอัตราส่วนของการสังเคราะห์อัลฟาและบีตาโกลบินในหลอดทดลอง (*in vitro* globin chain synthesis ratio) ซึ่งวิธีการทำจำเป็นต้องใช้สารรังสีและมีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยาก เช่น การแยกสายโกลบินด้วยโครมาโตกราฟี [1] จึงเป็นเทคนิคที่ใช้ในวงจำกัด เฉพาะห้องปฏิบัติการวิจัยที่มีความพร้อม ทั้งเครื่องมือและบุคลากรที่มีประสบการณ์ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

(qRT-PCR) มาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง Irenge และคณะได้นำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนบีตาโกลบินที่เกิดการกลายพันธุ์ และพบว่าเป็นวิธีที่มีความถูกต้องสูง ทำง่าย และรวดเร็ว [9-11]

ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกเทคนิค qRT-PCR มาใช้ในการศึกษาความไม่สมดุลของการสังเคราะห์สายอัลฟาและบีตาโกลบิน โดยตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ และพบว่าค่าอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ที่เบี่ยงเบนไปจากค่าของคนปกติ เป็นตัวชี้วัดถึงความรุนแรงของโรคที่ได้อย่างหนึ่ง

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ เป็นตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ณ โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อการควบคุมและป้องกันโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวนทั้งสิ้น 121 ราย แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติ (ไม่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย และมีปริมาณ Hb A₂ ปกติ) 14 ราย กลุ่มอัลฟาธาลัสซีเมีย 75 ราย และกลุ่มบีตาธาลัสซีเมีย 32 ราย งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE 451001)

2. การศึกษาข้อมูลทางโลหิตวิทยา

พารามิเตอร์เม็ดเลือดแดงของตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ ได้จากตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Coulter GEN System (Beckman Coulter, Inc., USA) และตรวจชนิดฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ Variant HPLC analyzer (Variant, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ที่หน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมีย

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ทำการตรวจโดยบุคลากรของโครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อการควบคุมและป้องกันโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตัวอย่างเลือดทุกรายจะถูกนำไปแยกเม็ดเลือดขาวเพื่อสกัดดีเอ็นเอ และนำไปตรวจยีนธาลัสซีเมียต่อไปนี้ α^0 -thalassemia (SEA-deletion), α^+ -thalassemia (3.7-kb และ 4.2-kb deletion), Hb CS, Hb PS, Hb E และบีตา-ธาลัสซีเมีย ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (7, 12-15)

4. การตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอ

4.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ

เม็ดเลือดแดงรวมทั้งเรติคูลocytes (reticulocyte) ที่เหลืออยู่หลังจากแยกเม็ดเลือดขาวออกไปแล้ว จะถูกนำไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอ Trizol™ (Invitrogen, California, USA) ซึ่งใช้หลักการของ Chomczynski (16) ดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนอยู่ในอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้ถูกกำจัดออกไปโดยการเติม DNase (Promega, Madison, WI, USA) จากนั้นวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ในการตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ใช้อาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้น 5 ng/ μ l จำนวน 5 μ l (25 ng)

4.2 การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการทำ real-time RT-PCR

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ชุดน้ำยา TaqMan one-step RT-PCR (Applied Biosystems, California, USA) โดยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ real-time RT-PCR ด้วยการปรับปริมาณของ primers, fluorescent-labelled probes และอาร์เอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา ตามลำดับดังนี้ 50-300 nM, 50-150 nM และ 25-100 ng ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมนี้ได้ใช้ pHE7 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มี cDNA ของอัลฟาและบีตาโกลบินอยู่อย่างละ 1 ยีน (17) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสม คือ สภาวะที่ให้ α/β -globin ratio = 1 ซึ่ง primers และ probes ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นชุดเดียวกับที่รายงานโดย Watanapokasin Y และคณะ (18) ดังแสดงใน Table 1 และตำแหน่งบน α - และ β -globin mRNA แสดงใน Figure 1 และได้ปรับอุณหภูมิในช่วงปฏิกิริยา annealing/ extension ระหว่าง 55-60°C

4.3 การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ

การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียใช้เทคนิค multiplex one-step real-time RT-PCR ในการทำและติดตามปฏิกิริยาใช้เครื่อง Rotor-Gene 3000 version 6.0 (Corbett Research, Sydney, New South Wales, Australia) โดยได้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.2 ดังนี้ ตัวอย่างแต่ละรายจะถูกตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate assay) ปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 13 μ l ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอ 25 ng, 115 nM forward and reverse primers, 50 nM fluorescent-labelled probes, 1xmaster mix (dNTP, AmpliTaq Gold DNA polymerase and optimized buffer) and 1xRT (MultiscribeTM reverse transcriptase and RNase inhibitor) นำเข้าเครื่อง Rotor-Gene 3000 เพื่อทำปฏิกิริยา ดังนี้

Reverse transcription: 48°C, 30 min

Reverse transcriptase inactivation and AmpliTaq Gold activation: 94°C, 10 min

35 PCR cycles: 94°C, 15 sec for denaturation

58°C, 1 min for annealing/extension

เมื่อทำปฏิกิริยาในเครื่อง Rotor-Gene 3000 version 6.0 เสร็จแล้ว ข้อมูลจะถูกถ่ายโอนเข้าสู่โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล ในการศึกษาครั้งนี้เลือกวิเคราะห์ข้อมูลแบบ relative quantitation ที่สามารถคำนวณอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ตามหลักการของ $2^{-\Delta\Delta CT}$ (19) โดยใช้พลาสมิด pHE7 เป็นมาตรฐานในการเทียบอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ non-parametric เนื่องจากข้อมูลไม่เป็น normal distribution โดยใช้โปรแกรม Minitab (1998; release 12.2: Minitab Inc, State College, PA) ข้อมูลอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างจะถือว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p-value <0.05

Table 1 Sequences of oligonucleotide primers and probes for real-time PCR.

Oligonucleotides	Sequences (5'→3')	Size of RT-PCR product
A: α -sense primer	GAGGCCCTGGAGAGGATGTTC	73 bp
B: α -antisense primer	CGTGGCTCAGGTCGAAGTG	
C: α -probe	6FAM-TGTCCTTCCCCACCAAGACCTACT-TAMRA	
D: β -sense primer	CTGTCCACTCCTGATGCTGTT	74 bp
E: β -antisense primer	GGCACCGAGCACTTTCTTG	
F: β -probe	VIC-TGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCA-TAMRA	

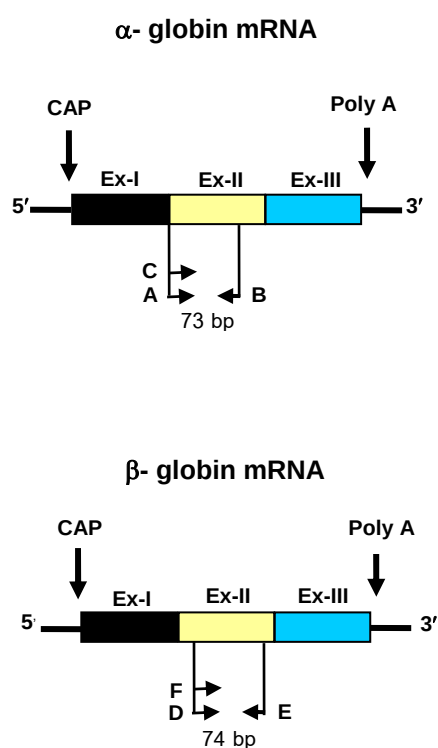


Figure 1 ตำแหน่งของ primers and probes บน α - และ β -globin mRNA

ผลการศึกษา

1. สภาวะเหมาะสมในการทำ real-time RT-PCR

การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการทำ real-time RT-PCR โดยใช้ชุดน้ำยา TaqMan one-step RT-PCR เมื่อใช้ primers 50-300 nM, fluorescent-labelled probes 50-150 nM และพลาสมิดมาตรฐาน pHE7 25-100 ng พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primer แต่ละตัวในปฏิกิริยา คือ 115 nM probe แต่ละตัวในปฏิกิริยา คือ 50 nM และใช้พลาสมิด 25 ng และมีรอบในการทำ RT-PCR ด้วยเครื่อง Rotor-Gene 3000 ดังนี้

Reverse transcription: 48 °C, 30 min

Reverse transcriptase inactivation and AmpliTaq Gold activation: 94 °C, 10 min

35 PCR cycles: 94 °C, 15 sec for denaturation

58 °C, 1 min for annealing/extension

โดยสภาวะเหมาะสมที่เลือกนี้ ให้ผลการตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA อยู่ในช่วง 0.90-1.10 และได้นำสภาวะเหมาะสมนี้ไปทดลองตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในผู้ป่วยอัลฟาธาลัสซีเมียที่ทราบจีโนไทป์แล้วอย่างละ 1 ราย ได้แก่ α -thalassemia 2 (α^+ -thalassemia) มียีนอัลฟาโกลบินขาดหายไป 1 ยีน α -thalassemia 1 (α^0 -thalassemia) มียีนอัลฟาโกลบินขาดหายไป 2 ยีน Hb H disease มียีนอัลฟาโกลบินขาดหายไป 3 ยีน และ Hb Bart's hydrops fetalis มียีนอัลฟาโกลบินขาดหายไปทั้ง 4 ยีน ผลการทดลองพบว่าค่า cycle threshold (C_T) ซึ่งเป็น cycle ที่ emission จากสาร fluorescent ที่ติดไว้กับ probe สูงกว่า base line (threshold) จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อมีจำนวนยีนอัลฟาโกลบินขาดหายไปเพิ่มมากขึ้น [Figure 2] สอดคล้องกับหลักการของการตรวจวัดโดยวิธี real-time PCR คือ เมื่อปริมาณ template น้อย จะต้องใช้ amplification cycle หลายรอบกว่า template ที่มีปริมาณมาก จึงจะมี emission ของ fluorescent ผ่าน base line ได้ ผลการศึกษาส่วนนี้แสดงว่าสภาวะเหมาะสมที่ได้นี้ตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ได้ตรงตามจีโนไทป์ของอัลฟาธาลัสซีเมีย จึงสามารถใช้ตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ได้

2. การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ

กลุ่มตัวอย่างที่ทำการตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงมีจำนวนทั้งสิ้น 121 ราย แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนปกติ 14 ราย กลุ่มอัลฟาธาลัสซีเมีย 75 ราย และกลุ่มบีตาธาลัสซีเมีย 32 ราย กลุ่มที่แสดงอาการทางคลินิก คือ มีภาวะซีด ได้แก่ ผู้ป่วยกลุ่ม Hb H disease และ β^0 -thalassemia/ Hb E มีผลการตรวจทางโลหิตวิทยาดังแสดงใน Table 2 ส่วนผลการตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงในกลุ่มต่างๆ มีดังนี้

2.1 กลุ่มคนปกติ

กลุ่มคนปกติในการศึกษาครั้งนี้ หมายถึง ผู้ที่ไม่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย และมีปริมาณ Hb A₂ ปกติ มีจำนวนทั้งสิ้น 14 ราย มีค่าอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงที่แสดงเป็น median (min-max) เท่ากับ 1.3 (0.9-2.9) [Table 3]

2.2 กลุ่มอัลฟาธาลัสซีเมีย

ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยอัลฟาธาลัสซีเมียจำนวนทั้งสิ้น 75 ราย แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ตามจำนวนยีนอัลฟาโกลบินที่ผิดปกติ [Table 3, กลุ่มย่อย 2-5] พบว่าอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA จะลดลงแปรตามจำนวนยีนอัลฟาโกลบินปกติที่เหลืออยู่ ดังนี้ กลุ่มที่มียีนอัลฟาโกลบินปกติเหลืออยู่ 3 ยีน และมียีนอัลฟาโกลบินที่ผิดปกติ 1 ยีน (one α -globin gene defects) มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA เท่ากับ 0.7(0.3-1.2) กลุ่มที่มียีนอัลฟาโกลบินปกติเหลืออยู่ 2 ยีน และมียีนอัลฟาโกลบินที่ผิดปกติ 2 ยีน (two α -globin gene defects) มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA เท่ากับ 0.5(0.2-0.9) กลุ่มที่มียีนอัลฟาโกลบินปกติเหลืออยู่ 1 ยีน และมียีนอัลฟาโกลบินที่ผิดปกติ 3 ยีน (three α -globin gene defects or Hb H disease) มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA เท่ากับ 0.2(0.1-0.5) และกลุ่มที่มียีนอัลฟาโกลบินที่ผิดปกติทั้ง 4 ยีน (Hb Bart's hydrops fetalis) จะตรวจไม่พบ α -globin mRNA เลย จึงทำให้อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA มีค่าเป็น 0 ตัวอย่างเลือดที่มียีน Hb CS และ Hb PS มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ไม่แตกต่างจากตัวอย่างเลือดที่มียีนอัลฟาโกลบินผิดปกติ 1 ยีน ในผู้ป่วย Hb H disease ซึ่งส่วนใหญ่จะมีอาการซีดเล็กน้อย และเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็กลง ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของภาวะซีดและอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA [Table 2]

2.3 กลุ่มบีตาธาลัสซีเมีย

ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียมีจำนวนทั้งสิ้น 32 ราย แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มย่อย [Table 4] ในแต่ละกลุ่มย่อยมีจำนวนตัวอย่างไม่มากนัก จึงวิเคราะห์ผลที่ได้ตามข้อมูลที่ปรากฏให้เห็น ไม่ได้มีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ กลุ่มพาหะบีตาธาลัสซีเมีย มีจำนวน 17 ราย ประกอบด้วย $\beta^{41/42}$ (-TTCT) 9 ราย, β^{17} (AAG-TAG) 5 ราย, β^{15} (TGG-TAG) 1 ราย และ $\beta^{3.4}$ kb deletion 1 ราย ในกลุ่มนี้มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ประมาณ 2 เท่าของคนปกติ คือ 2.4 (1.2-3.7) การมีอัลฟาธาลัสซีเมียหรือ Hb CS ร่วมกับพาหะบีตาธาลัสซีเมีย มีผลทำให้อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ลดลงใกล้เคียงกับคนปกติ คือ 1.3 (0.9-1.5) กลุ่มพาหะบีตาบวกรธาลัสซีเมีย จำนวน 2 ราย มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA อยู่ในช่วงของคนปกติ คือ 1.6 และ 2.1 การมีอัลฟาธาลัสซีเมียหรือ Hb CS ร่วมกับพาหะบีตาบวกรธาลัสซีเมีย มีผลทำให้อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ลดลงเล็กน้อย คือ 1.3 (0.7-2.3) การที่มียีน Hb E และบีตาธาลัสซีเมียร่วมกัน (โรคบีตาบีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี) มีผลต่ออัตราส่วนของ α/β -globin mRNA และความรุนแรงของภาวะซีดอย่างมาก ในรายที่มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ต่ำกว่า จะมีภาวะซีดน้อยกว่า [Table 3; BE-1 อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA = 10.1 และ Hb = 11.1 g/dl] ในรายที่มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA สูงกว่า จะมีภาวะซีดมากกว่า [Table 3; BE-2 อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA = 43.3.1 และ Hb = 7.6 g/dl และ BE-3 อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA = 28.9 และ Hb = 6.1 g/dl] เมื่อมีอัลฟาธาลัสซีเมียร่วม (BE-5) หรือ Hb CS

รวม (BE-6) มีผลทำให้อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ลดลงอย่างมาก (6.1 และ 5.0 ตามลำดับ) พร้อมทั้งทำให้ความรุนแรงของภาวะซีดลดลงด้วย (Hb = 11.9 g/dl และ 11.5 g/dl ตามลำดับ)

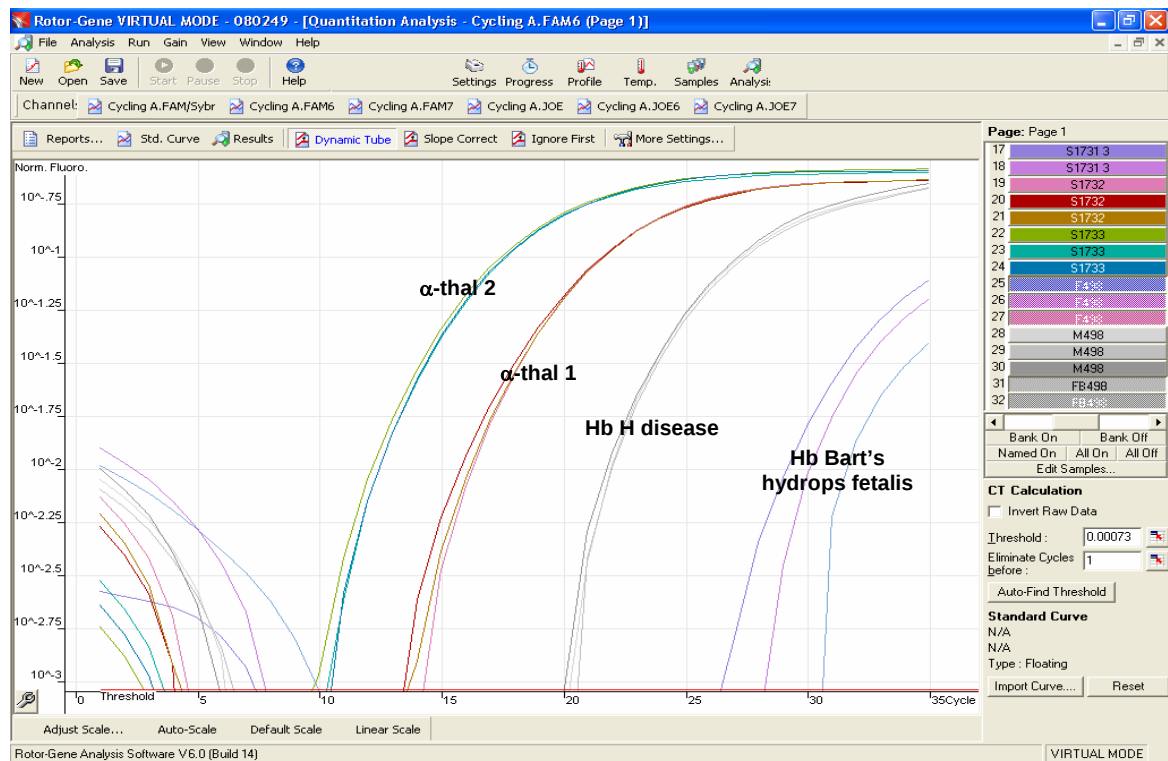


Figure 2 Quantitative real-time RT-PCR in known α -thalassemia genotypes showed an increased of he C_T values when the number of α -globin gene deleted is increased (α -thal 2: α -globin gene deleted, α -thal 1: two α -globin gene deleted, Hb H disease: three α -globin gene deleted and Hb Bart's hydrops fetalis: four α -globin gene deleted).

Table 2 Hematological profile, genotype and α/β mRNA ratio of Hb H and β -thalassemia/HbE subjects

Patients	Genotypes	α/β mRNA ratio	Hb (g/dl)	Hct (%)	RBC ($\times 10^{12}/l$)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	RDW (%)
1. Hb H disease*									
H-1	SEA/ $\alpha^{3.7}$	0.1	9.8	27.9	4.50	62.0	21.8	35.1	16.7
H-2	SEA/ $\alpha^{3.7}$	0.1	8.1	25.8	4.76	54.1	17.0	31.3	23.0
H-3	SEA/ $\alpha^{3.7}$	0.2	8.9	29.4	5.46	53.8	16.4	30.4	23.3
H-4	SEA/ $\alpha^{3.7}$	0.2	10.4	33.5	6.25	53.5	16.7	31.1	30.4
H-5	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.1	8.3	30.6	4.56	67.1	18.3	27.2	21.7
H-6	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.4	8.5	30.4	4.67	65.1	18.2	28.0	22.6
H-7	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.1	8.5	29.6	4.29	69.0	19.9	28.9	22.6
H-8	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.1	4.8	20.2	2.60	77.7	18.5	23.8	28.3
H-9	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.2	8.3	30.5	4.28	71.3	19.4	27.2	24.8
H-10	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.2	11.3	38.7	5.71	67.8	19.8	29.2	23.9
H-11	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.3	8.1	28.2	4.31	65.4	18.8	28.7	25.4
H-12	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.4	9.0	30.5	3.59	84.8	25.0	29.4	19.5
H-13	SEA/ $\alpha^{CS}\alpha$	0.5	8.1	30.1	4.82	62.3	16.8	26.9	22.2
H-14	SEA/ $\alpha^{PS}\alpha$	0.2	6.8	27.5	3.89	70.7	17.5	24.7	30.3
2. β-thalassemia/HbE									
BE-1	$\beta^E/\beta^{43(AAG-TAG)}$	10.1	11.1	31.8	5.80	54.7	19.1	34.9	28.9
BE-2	$\beta^E/\beta^{43(AAG-TAG)}$	43.3	7.6	25.1	3.81	66.0	20.0	30.5	36.1
BE-3	$\beta^E/\beta^{IVS\#5(G-C)}$	28.9	6.1	21.2	-	64.0	-	-	-
3. β-thalassemia/HbE with α-thalassemia									
BE-4	$\beta^E/\beta^{41/42(-TTCT)},$ $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$	6.1	11.9	33.4	6.05	55.2	19.7	35.6	26.7
BE-5	$\beta^E/\beta^{41/42(-TTCT)},$ $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	5.0	11.5	32.8	6.60	49.9	17.5	35.1	29.6

* 3 patients had no hematological data

Table 3 Median (min-max) of α/β -globin mRNA ratio in normal and α -thalassemia subjects

Genotypes	No.	α/β mRNA ratio	α/β gene ratio
1. Normal control	14	1.3 (0.9-2.9) *	2.0
2. One α -globin gene defects			1.5
2.1 $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	10	0.8 (0.6-1.2)	
2.2 $\alpha^{CS}/\alpha\alpha$	11	0.6 (0.3-1.1)	
Subtotal	21	0.7 (0.3-1.2) *	
3. Two α -globin gene defects			1.0
3.1 $\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$	23	0.5 (0.2-0.9)	
3.2 $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$	3	0.5 (0.5-0.7)	
3.3 $\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}$	4	0.3 (0.3-0.8)	
3.4 α^{CS}/α^{CS}	3	0.4 (0.3-0.5)	
3.5 α^{CS}/α^{PS}	1	0.5	
Subtotal	34	0.5 (0.2-0.9) *	
4. Three α -globin gene defects (Hb H disease)			0.5
4.1 $\alpha^{SEA}/\alpha^{3.7}$	6	0.2 (0.1-0.2)	
4.2 α^{SEA}/α^{CS}	10	0.2 (0.1-0.5)	
4.3 α^{SEA}/α^{PS}	1	0.2	
Subtotal	17	0.2 (0.1-0.5) *	
5. Four α -globin gene defects (Hb Bart's hydrops fetalis)			0.0
5.1 $\alpha^{SEA}/\alpha^{SEA}$	3	0 (0-0)	

* α/β mRNA ratios were significantly different among the 4 groups (p -value < 0.001, for both Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U-test)

Table 4 Median (min-max) of α/β -globin mRNA ratio in β -thalassemia including coinheritance with α -thalassemia

Genotype	No.	α/β mRNA ratio
1. Heterozygous β^0 -thalassemia		
1.1 $\beta^{41/42}$ (-TTCT)	9	2.4 (1.4-3.7)
1.2 β^{17} (AAG-TAG)	5	2.4 (1.2-3.2)
1.3 β^{15} (TGG-TAG)	1	2.7
1.4 $\beta^{3.4}$ kb deletion	1	2.2
Subtotal	16	2.4 (1.2-3.7)
2. Heterozygous β^0 -thalassemia with α -thalassemia		
2.1 $\beta^{41/42}$ (-TTCT), $_{-}\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	1	1.5
2.2 $\beta^{71/72}$ (+A), $_{-}\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	1	1.3
2.3 β^{17} (AAG-TAG), $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	1	1.2
2.4 β^{17} (AAG-TAG), $_{-}\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$	1	0.9
Subtotal	4	1.3 (0.9-1.5)
3. Heterozygous β^+ -thalassemia (β^{-28} (A-G))		
	2	1.6, 2.0
4. Heterozygous β^+ -thalassemia with α -thalassemia		
4.1 β^{-28} (A-G), $_{-}\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	3	1.3, 1.6, 2.3
4.2 β^{-28} (A-G), $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	1	1.1
4.3 β^{-28} (A-G), $_{-}\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$	1	0.7
Subtotal	5	1.3 (0.7-2.3)
5. β^0 -thalassemia/Hb E		
5.1 β^E/β^{43} (AAG-TAG)	2	10.1, 43.3
5.2 $\beta^E/\beta^{IVS\#5}$ (G-C)	1	28.9
6. β^0 -thalassemia/Hb E with α -thalassemia		
6.1 $\beta^E/\beta^{41/42}$ (-TTCT), $_{-}\alpha^{3.7}/_{-}\alpha^{3.7}$	1	6.1
6.2 $\beta^E/\beta^{41/42}$ (-TTCT), $\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	1	5.0

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ในคนปกติมีการสังเคราะห์สายบีตาโกลบินมาจากยีนบีตาโกลบินเพียง 1 ยีน ที่อยู่บนแต่ละข้างของโครโมโซมคู่ที่ 16 ขณะที่การสังเคราะห์สายอัลฟาโกลบินมาจากยีนอัลฟาโกลบิน 2 ยีน ที่อยู่บนแต่ละข้างของโครโมโซมคู่ที่ 11 ได้เป็นสายอัลฟาและบีตาโกลบินที่สมดุลกันพอดีในการรวมกันเป็นฮีโมโกลบิน หากมีความไม่สมดุลกันเกิดขึ้น จะทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมีย ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA จากเม็ดเลือดแดงของคนปกติจำนวน 14 ราย พบว่าค่าที่ได้คือ 1.3(0.9-2.9) อยู่ในช่วงค่าเดียวกับที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้วว่า ในเม็ดเลือดแดงจะมีปริมาณ α -globin mRNA มากกว่า β -globin mRNA ประมาณ 1.2-2.3 เท่า (20-23) อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ที่สูงถึง 4.2-4.5 ก็เคยมีผู้รายงานไว้ (24-25) ในการศึกษาเหล่านี้ใช้เทคนิค liquid hybridization ซึ่งในขั้นตอนการทำ hybridization มีหลายปัจจัยมารบกวนผลการตรวจวัดได้ เช่น stringency ในการทำ hybridization และ activity ของสารรังสีที่ใช้ติดฉลาก probe เป็นต้น อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในเม็ดเลือดแดงของคนปกติที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะต่ำกว่าอัตราส่วนของ α/β -globin gene ประมาณครึ่งหนึ่ง แสดงว่าน่าจะมีการควบคุมในระดับ mRNA เพื่อให้เกิดสมดุลระหว่างการสังเคราะห์อัลฟาและบีตาโกลบิน ซึ่งยังไม่มีข้อมูลโดยตรงที่สนับสนุนสมมุติฐานนี้ แต่การค้นพบโปรตีนที่จับกับอัลฟาโกลบินและช่วยให้อัลฟาโกลบินอิสระที่ไม่ได้จับบีตาโกลบินมีความคงตัว (α -globin stabilizing protein; AHSP) ซึ่งให้เห็นถึงความเป็นไปได้ว่า เม็ดเลือดแดงอาจจะมีอัลฟาโกลบินมากกว่าบีตาโกลบิน (26) ปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่อาจมีผลทำให้อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA แตกต่างกันไปในตัวอย่างเลือดแต่ละราย คือ การสกัด RNA จาก reticulocyte นั้น reticulocyte ที่อยู่ในตัวอย่างเลือดแต่ละรายนั้น อาจอยู่ในระยะการแก่ตัว (developmental stages) ที่แตกต่างกัน ขณะที่ reticulocyte แก่ตัวนั้น จะค่อยสลาย RNA ไป ดังนั้น reticulocyte ที่มีระยะการแก่ตัวที่ต่างกัน จึงอาจมีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ที่แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ถึงแม้จะไม่ได้ตรวจนับจำนวนและระยะต่างๆ ของ reticulocyte ในตัวอย่างเลือด แต่ตัวอย่างเลือดทุกรายจะถูกนำมาสกัด RNA ทันทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดจากผู้ที่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย พบว่ามีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ลดลงเมื่อมีจำนวนยีนอัลฟาโกลบินผิดปกติเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าการสังเคราะห์ mRNA ที่ลดลงนั้นเนื่องจากยีนอัลฟาโกลบินปกติที่สามารถสังเคราะห์ mRNA ได้ มีจำนวนลดลง ผลการศึกษาที่ได้ครั้งนี้สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานโดยคณะนักวิจัยหลายกลุ่ม (20, 23-24) ถึงแม้ว่าอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ที่รายงานโดยนักวิจัยแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกัน ขึ้นกับวิธีการตรวจวัดที่ใช้ การตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ให้ข้อมูลที่แสดงถึงจำนวนยีนอัลฟาโกลบินผิดปกติไป ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจหาพาหะอัลฟาธาลัสซีเมียได้

นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในตัวอย่างเลือดที่มียีน Hb CS หรือ Hb PS นั้นไม่แตกต่างจากอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายไปของยีนอัลฟาโกลบิน [Table 3] แสดงว่า mRNA ของ Hb CS และ Hb PS มีปริมาณน้อยมาก ทำให้อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ที่วัดได้ใกล้เคียงกับค่าที่ตรวจวัดจากกลุ่มอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายไปของยีนอัลฟาโกลบิน ซึ่ง

สามารถอธิบายได้จากความไม่เสถียรของ mRNA เนื่องจากการกลายพันธุ์ของ stop codon ทำให้ปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างส่วน 3'-UTR ของ mRNA และโปรตีนเป็น α -complex ซึ่งช่วยป้องกันการเกิด deadenylation และการถูกย่อยสลายโดย endoribonuclease (27) ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ จึงสลายไปเร็วกว่า mRNA ของอัลฟาโกลบินปกติ แม้ Hb CS และ Hb PS จะมีในเม็ดเลือดแดงเพียงปริมาณน้อยๆ ก็สามารถทำให้เกิด oxidative damage ต่อผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงได้ (28-29) จากรายงานการศึกษาที่พบว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง ASHP กับ α^{CS} และ α^{PS} นั้นเกิดได้ไม่ดี (30) จึงเป็นไปได้ว่าอาจมี α^{CS} และ α^{PS} ที่เป็นอิสระ และไปจับกับผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดพยาธิสภาพกับเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นด้วย

กลุ่มตัวอย่างเลือดจากผู้ที่มียืนบีตาธาลัสซีเมียพบว่า พาหะบีตาธาลัสซีเมียมีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA สูงกว่าตัวอย่างเลือดจากคนปกติ ในขณะที่บีตาธาลัสซีเมียมีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA อยู่ในช่วงเดียวกับตัวอย่างเลือดจากคนปกติ [Table 4] เมื่อพิจารณาถึงชนิดของการกลายพันธุ์ที่พบใน พาหะบีตาธาลัสซีเมีย พบว่าเกือบทั้งหมดเป็นการกลายพันธุ์แบบ nonsense mutation ที่เกิดอยู่บน exon 1 และ 2 (ยกเว้น $\beta^{3.4\text{kb deletion}}$) จึงเป็นไปได้ว่า mRNA ของบีตาโกลบินที่ผิดปกติเหล่านี้จะถูกทำลายไปด้วยกระบวนการ nonsense-mediated mRNA decay (NMD) (31) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการสลาย mRNA ที่ผิดปกตินี้ ยังขึ้นกับตำแหน่งของการกลายพันธุ์ด้วย โดยพบว่าการกลายพันธุ์ที่อยู่บน exon 1 mRNA จะถูกสลายไปได้เร็วกว่าการกลายพันธุ์ที่อยู่บน exon 2 (32) การมียืนอัลฟาธาลัสซีเมียร่วมกับยืนบีตาธาลัสซีเมียช่วยทำให้สมดุลระหว่าง α -globin mRNA และ β -globin mRNA ดีขึ้น เห็นได้จากอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ที่กลับเข้ามาอยู่ในช่วงค่าปกติ

ผู้ป่วยโรค β^0 -thalassemia/Hb E มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA สูงที่สุด และพบว่าอัตราส่วนนี้จะแปรตามความรุนแรงของภาวะซีด [Table 2] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Watanapokasin Y และคณะ (18) และการมียืนอัลฟาธาลัสซีเมียร่วมด้วยช่วยให้อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ลดลงอย่างมากและมีผลทำให้ความรุนแรงของภาวะเลือดจางดีขึ้นด้วย ปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ากลไกใดที่ทำให้ผู้ป่วยโรค β^0 -thalassemia/Hb E แต่ละรายจึงมีความรุนแรงของภาวะเลือดจางแตกต่างกัน ทั้งๆ ที่มีจีโนไทป์เดียวกันและไม่มียืนอัลฟาธาลัสซีเมียหรือยืนทำให้มี Hb F สูงร่วมด้วย เหตุผลหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ alternative splicing ของ β^E -globin ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยแต่ละรายนั้นมีความแตกต่างกัน (33) อย่างไรก็ตามการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ผู้ป่วยโรค β^0 -thalassemia/Hb E ที่มีอาการรุนแรงน้อยกว่า จะมีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ที่เข้าใกล้ช่วงค่าปกติมากกว่า

การศึกษารังนี้สรุปได้ว่า เทคนิค multiplex qRT-PCR นี้ เหมาะสำหรับการตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในตัวอย่างเลือดธาลัสซีเมีย เนื่องจากเทคนิคการทำไม่ยุ่งยาก และมีความถูกต้องแม่นยำสูง จากการตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ในตัวอย่างเลือดอัลฟาธาลัสซีเมีย ค่าอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ที่ตรวจวัดได้จะลดลงขึ้นกับจำนวนยืนอัลฟาโกลบินที่ผิดปกติ และในบีตาธาลัสซีเมียอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีถึงความรุนแรงของโรค

เอกสารอ้างอิง

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford: Blackwell Science, 2001.
2. Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia in Southeast Asia: problems and strategy for prevention and control. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1992;23: 647-55.
3. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia: molecular biology and clinical medicine. Hemoglobin 1997;21:299-319.
4. Fucharoen G, Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Sae-Ung N, Suyasanond U, Sriwilai P, Chinorak P. Frequency distribution and haplotypic heterogeneity of β^E -Globin gene among eight minority groups of northeast Thailand. Hum Hered. 2002;53:18-22.
5. Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G, Sanguansermsri T, Das BM, Deka R, Yongvanit P, Mularlee N. The distribution of the Hb constant spring gene in Southeast Asian populations. Hum Genet. 1990;84:188-90.
6. Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Pung-Amritt P, Petrarat S, Suwantol L, Fisher C, Higgs DR. Clinical phenotypes and molecular characterization of Hb H-Pakse disease. Haematologica. 2002;87:117-25.
7. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Hb Pakse [(α 2) codon 142 (TAA $\rightarrow$ TAT or Term $\rightarrow$ Tyr)] in Thai patients with EABart's disease and Hb H Disease. Hemoglobin. 2002;26:227-35.
8. Thein SL. Pathophysiology of β -thalassemia--A guide to molecular therapies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005;31-7.
9. Irenge LM, Robert A, Gala JL. Quantitative assessment of the transcriptional impact of mutations in the 3'untranslated region of the human beta-globin gene: application to the +1480 C $\rightarrow$ G mutation. Haematologica. 2006;91:1563-4.
10. Irenge LM, Robert A, Gala JL. Quantitative assessment of human beta-globin gene expression in vitro by TaqMan real-time reverse transcription-PCR: comparison with competitive reverse transcription-PCR and application to mutations or deletions in noncoding regions. Clin Chem. 2005;5:2395-6.
11. Irenge LM, Heusterspreute M, Philippe M, Derclaye I, Robert A, Gala JL. Validation of a recombinant DNA construct (micro LCR and full-length beta-globin gene) for quantification of human beta-globin expression: application to mutations in the promoter, intronic, and 5'- and 3'-untranslated regions of the human beta-globin gene. Clin Chem. 2002;48:1787-91.

12. Fucharoen S, Fucharoen G, Fukumaki Y. Simple non-radioactive method for detecting haemoglobin Constant Spring gene. *Lancet* 1990; 335:1527.
13. Fucharoen G, Fucharoen S. Rapid and simultaneous non-radioactive method for detecting α -thalassemia 1 (SEA-type) and Hb Constant Spring genes. *Eur J Haematol* 1994; 53: 186-7.
14. Fucharoen S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Pengjam Y. Molecular analysis of a Thai β -thalassemia heterozygote with normal haemoglobin A2 level: implication for population screening. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 44-9.
15. Siriratmanawong N, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Simultaneous PCR detection of β -thalassemia and α -thalassemia 1 (SEA type) in prenatal diagnosis of complex thalassemia syndrome. *Clin Biochem* 2001; 34: 77-80.
16. Chomczynski PA. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-7.
17. Shen TJ, Ho NT, Zou M, Sun DP, Cottam PF, Simplaceanu V, Tam MF, Bell DA Jr, Ho C. Production of human normal adult and fetal hemoglobins in *Escherichia coli*. *Protein Eng.* 1997;10:1085-97.
18. Watanapokasin Y, Winichagoon P, Fucharoen S, Wilairat P. Relative quantitation of mRNA in β -thalassemia/Hb E using real-time polymerase chain reaction. *Hemoglobin* 2000; 24:105-16.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
20. Hunt DM, Higgs DR, Old JM, Clegg JB, Weatherall DJ, Marsh GW. Determination of alpha thalassemia phenotypes by messenger RNA analysis. *Br J Haematol* 1980; 45: 53-64.
21. Hunt DM, Higgs DR, Winichagoon P, Clegg JB, Weatherall DJ. Haemoglobin Constant Spring has an unstable α chain messenger RNA. *Br J Haematol* 1982; 51: 405-13.
22. Huang SZ, Rodgers GP, Zeng FY, Zeng YT, Schechter AN. Diagnosis of thalassemia using cDNA amplification of circulating erythroid cell mRNA with the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78: 2433-7.
23. Lin SF, Liu TC, Chen TP, Chiou SS, Liu HW, Chang JG. Diagnosis of thalassemia by non-isotope detection of α/β and ζ/α mRNA ratios. *Br J Haematol* 1994; 87: 133-8.
24. Smetanina NS, Leonova JY, Levy N, Huisman THJ. The α/β - and $\alpha 2/\alpha 1$ -globin mRNA ratios in different forms of α -thalassemia. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1315: 188-92.
25. Smetanina N, Molchanova T, Huisman T. Analysis of mRNA from red blood of patients with thalassemia and hemoglobin variants. *Hemoglobin* 1997; 21: 437-67.

26. Kihm AJ, Kong Y, Hong W, Russell JE, Rouda S, Adachi K, et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free α -haemoglobin Nature 2002; 417: 758-63.
27. Waggoner SA, Liebhaber SA. Regulation of α -globin mRNA stability. Exp Biol Med 2003; 288: 387-95.
28. Turbpaiboon C, Siritantikorn A, Thongnoppakhun W, Bunditworapoom D, Limwongse C, Yenchitsomanus PT, Siritanaratkul N, Wilairat P. Hemoglobin Pakse': presence on red blood cell membrane and detection by polymerase chain reaction-single-strand conformational polymorphism. Int J Hematol. 2004; 80: 136-9.
29. Peerapittayamongkol C, Bernini LF, Wilairat P. Presence of α^{CS} -globin on membrane of red cell containing hemoglobin Constant Spring (CS). J Sci Soc Thailand 1996; 22: 117-20.
30. Turbpaiboon C, Limjindaporn T, Wongwiwat W, U-Pratya Y, Siritanaratkul N, et al. Impaired interaction of α -haemoglobin-stabilising protein with α -globin termination mutant in a yeast two-hybrid system. Br J Haematol 2005; 132: 370-3.
31. Baserga SJ, Benz JEJ. Nonsense mutations in the human β -globin gene affect mRNA metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 2056-60. metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 2056-60.
32. Inacio A, Silva AL, Pinto J, Ji X, Morgado A, Almeida F, Faustino P, Lavinha J, Liebhaber SA, Romao L. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. J Biol Chem 2004; 279: 32170-80.
33. Winichagoon P, Fucharoen S, Wilairat P, Chihara K, Fukumaki Y. Role of alternatively spliced β^{E} -globin mRNA on clinical severity of β -thalassemia/hemoglobin E disease. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995; 26 Suppl 1: 241-5.

OUTPUT ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

1. Chaisue C, **Kitcharoen S**, Wilairat P, Jetsrisuparb A, Fucharoen G, Fucharoen S. α/β -globin mRNA ratio determination by multiplex quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction as an indicator of globin gene function. Clin Biochem 2007; 40:1373-1377.

ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

1. จุฬาร ใจซื่อ, **สุทธิพรณ กิจเจริญ**, กุลนภา พุเจริญ, สุพรรณ พุเจริญ, อัตราส่วนของอัลฟา/บีตาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอในอัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ต่างๆ: การตรวจวัดด้วยเทคนิคเรียลไทม์อาร์ที-พีซีอาร์. การประชุมวิชาการประจำปี สมาคมเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 30 วันที่ 28-31 มีนาคม 2549 โรงแรมเรณูศรี แกรนด์ รอยัล อุดรธานี (poster presentation).
2. Chulaporn Chaisue, **Suttiphan Kitcharoen**, Goonnapa Fucharoen, Arunee Jetsrisuparp, Supan Fucharoen. The α -/ β -globin mRNA ratios in various genotypes of β -thalassemia. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6 วันที่ 13-14 ตุลาคม 2549 ณ อาคารมหิตลาธิเบศร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (poster presentation).

APPENDIX

(ภาคผนวก)

α/β -Globin mRNA ratio determination by multiplex quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction as an indicator of globin gene function

Chulaporn Chaisue^{a,b}, Suttiphan Kitcharoen^{a,*}, Prapon Wilairat^c, Arunee Jetsrisuparb^d,
Goonnapa Fucharoen^a, Supan Fucharoen^a

^a Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

^b Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

^c Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^d Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Received 8 May 2007; received in revised form 3 July 2007; accepted 6 August 2007

Available online 15 August 2007

Abstract

Objectives: Imbalance in α/β -globin chains is an important determinant of thalassemia disease severity. This study examined the relationship between α/β -globin mRNA ratio and disease severity in various thalassemia genotypes.

Design and methods: α - and β -globin mRNA contents of red blood cells of 75 α - and 32 β -thalassemia subjects (5 with β^0 -thalassemia/Hb E) and 14 normal controls were measured using multiplex quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The α/β -globin mRNA ratio of each sample was calculated based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Results: A decrease of α/β -globin mRNA ratios in α -thalassemia subjects compared to normal controls correlated with the numbers of defective α -globin genes, whereas an increase of the ratios was observed in β -thalassemia. Subjects with β^0 -thalassemia/Hb E disease had the highest α/β -globin mRNA ratio, followed by β^0 -thalassemia trait and then β^+ -thalassemia trait, which correlated with decrease in severity of anemia. Coinheritance of α -thalassemia in β^0 -thalassemia/Hb E resulted in a more balanced α/β -globin mRNA ratio and an amelioration of the anemia.

Conclusions: This study indicates that imbalance in globin gene expression, the major factor affecting clinical severity of thalassemia, could be demonstrated by measuring α/β -globin mRNA ratio, which was conveniently and accurately determined by qRT-PCR. In α -thalassemia, α/β -globin mRNA ratio correlated with the number of functional α -globin genes present, whereas in β -thalassemia, the ratio provided a good indicator of disease severity.

© 2007 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Thalassemia; Imbalance of globin chain; α/β -Globin mRNA ratio; qRT-PCR

Introduction

Thalassemia is a heterogeneous group of genetic disorders of hemoglobin synthesis, characterized by a decrease in the production of globin chains [1]. The two most clinically relevant thalassemia syndromes are the α - and β -thalassemias.

α -Thalassemia is caused by deletion or mutation affecting either one or more of the duplicated α -globin genes, located on chromosome 16pter-p13.3, whereas β -thalassemia is caused by point mutations in β -globin gene, located on chromosome 11p15.5, leading to an absence or decrease in globin chain production from the affected genes. Both α - and β -thalassemias are highly prevalent in Southeast Asia, including in Thailand where the prevalence of α -thalassemia reaches 20–30% and that of β -thalassemia is between 3 and 9% [2].

* Corresponding author. Fax: +66 43 202 087.

E-mail address: sutpra@kku.ac.th (S. Kitcharoen).

Furthermore, both α -chain and β -chain variants are also present at a high frequency in Southeast Asian region. In Thailand, the two most common hemoglobin (Hb) variants in Thailand are hemoglobin E (Hb E) and Hb Constant Spring (CS). Hb E results from a single amino acid substitution of lysine by glutamic acid, due to a point mutation ($GAG > AAG$) in codon 26 of the β -globin gene. Its prevalence in Thailand is about 13%, with the highest frequency of about 50% observed in the northeast part of the country [3,4]. Hb CS, caused by $\alpha 2$ -globin gene termination codon mutation ($TAA > CAA$, Gln) is the most common mutation among non-deletional α -thalassemia with an estimated prevalence of 1–8% [3,5]. In addition to Hb CS, Hb Paksé (PS), another Hb variant arising from $\alpha 2$ -globin gene termination codon mutation ($TAA > TAT$, Tyr), has also been reported with a significant prevalence [6,7].

Interactions of these hemoglobinopathies are thus not uncommon in the Thai population and lead to thalassemia syndromes with a variety of phenotypes, ranging from asymptomatic to severe anemia. Phenotypic diversity of thalassemia depends on the extent of imbalance between α - and non- α -globin chains [1,8]. The most direct method for determining imbalance in α /non- α -globin chain ratio is measurement of α / β -globin synthesis ratio *in vitro*. This involves the incubation of reticulocytes with radioactive amino acids such as ^3H -leucine, which requires not only handling of radionuclides, but also a chromatographic separation step of the two types of globin chains before quantitation by liquid scintillation counting can be made [1]. Recently, Ireng et al. developed quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) to quantify the *in vitro* expression of mutated β -globin genes and demonstrated that qRT-PCR is an accurate method used to assess transcriptional

impact of β -globin gene [9,10]. This method, compared to competitive RT-PCR [11], has been proven to be faster, less labor-intensive, and devoid of molecular carryover.

In the present study, we have chosen to determine α / β -globin mRNA ratios in thalassemia using qRT-PCR and show that the deviations in α / β -globin mRNA ratio from normal control value are good indicators of thalassemia disease severity.

Materials and methods

Subjects

A total of 107 thalassemia EDTA-blood samples (75 α -thalassemia, 27 β -thalassemia and 5 β^0 -thalassemia/Hb E) were recruited from prenatal diagnosis blood samples obtained at Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. Samples from 14 healthy individuals who had normal Hb profile and no α -thalassemia gene were also included in this study. Hb phenotypes of all samples were identified using Hb/HPLC analyzer (Variant, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Ethical approval of the study protocol was obtained from the Ethical Committee of Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand (HE 481016). The hematological profiles of subjects with Hb H and β^0 -thalassemia/Hb E are shown in Table 1.

DNA analysis

Identification of α^0 -thalassemia (SEA-type), α^+ -thalassemia (3.7- and 4.2-kb deletion), Hb CS, Hb PS, Hb E and β -thalassemia mutations in genomic DNA extracted from blood

Table 1
Hematological profile, genotype and α / β mRNA ratio of Hb H and β -thalassemia/HbE subjects

Patient	Genotype	α / β mRNA ratio	Hb (g/dL)	Hct (%)	RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)
(1) Hb H disease ^a									
H-1	SEA/ $\alpha^{3.7}$	0.1	9.8	27.9	4.50	62.0	21.8	35.1	16.7
H-2	SEA/ $\alpha^{3.7}$	0.1	8.1	25.8	4.76	54.1	17.0	31.3	23.0
H-3	SEA/ $\alpha^{3.7}$	0.2	8.9	29.4	5.46	53.8	16.4	30.4	23.3
H-4	SEA/ $\alpha^{3.7}$	0.2	10.4	33.5	6.25	53.5	16.7	31.1	30.4
H-5	SEA/ α^{CS}	0.1	8.3	30.6	4.56	67.1	18.3	27.2	21.7
H-6	SEA/ α^{CS}	0.4	8.5	30.4	4.67	65.1	18.2	28.0	22.6
H-7	SEA/ α^{CS}	0.1	8.5	29.6	4.29	69.0	19.9	28.9	22.6
H-8	SEA/ α^{CS}	0.1	4.8	20.2	2.60	77.7	18.5	23.8	28.3
H-9	SEA/ α^{CS}	0.2	8.3	30.5	4.28	71.3	19.4	27.2	24.8
H-10	SEA/ α^{CS}	0.2	11.3	38.7	5.71	67.8	19.8	29.2	23.9
H-11	SEA/ α^{CS}	0.3	8.1	28.2	4.31	65.4	18.8	28.7	25.4
H-12	SEA/ α^{CS}	0.4	9.0	30.5	3.59	84.8	25.0	29.4	19.5
H-13	SEA/ α^{CS}	0.5	8.1	30.1	4.82	62.3	16.8	26.9	22.2
H-14	SEA/ α^{PS}	0.2	6.8	27.5	3.89	70.7	17.5	24.7	30.3
(2) β -Thalassemia/HbE									
BE-1	$\beta^{\text{E}}/\beta^{43(\text{AAG-TAG})}$	10.1	11.1	31.8	5.80	54.7	19.1	34.9	28.9
BE-2	$\beta^{\text{E}}/\beta^{43(\text{AAG-TAG})}$	43.3	7.6	25.1	3.81	66.0	20.0	30.5	36.1
BE-3	$\beta^{\text{E}}/\beta^{\text{IVS}\#5(\text{G-C})}$	28.9	6.1	21.2	—	64.0	—	—	—
(3) β -Thalassemia/HbE with α -thalassemia									
BE-4	$\beta^{\text{E}}/\beta^{41/42(-\text{TTCT})}, \alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$	6.1	11.9	33.4	6.05	55.2	19.7	35.6	26.7
BE-5	$\beta^{\text{E}}/\beta^{41/42(-\text{TTCT})}, \alpha^{\text{CS}}/\alpha/\alpha$	5.0	11.5	32.8	6.60	49.9	17.5	35.1	29.6

^a Three patients had no hematological data.

leukocytes were performed using standard PCR methodologies [7,12–15].

RNA analysis

Total RNA was isolated from peripheral red blood cells, which included reticulocytes, using Trizol™ reagent kit (Invitrogen, California, USA) [16]. RNA concentration and purity were determined by measuring absorbance at 260 and 280 nm (UV 1101 photometer, Biotech Photometer, Cambridge, CB16NW, UK). DNA contamination in the RNA sample was eliminated by DNase treatment (Promega, Madison, WI, USA). Multiplex one-step real-time RT-PCR for quantification of α - and β -globin mRNA was performed in 13 μ L volume containing 25 ng of RNA, 115 nM of each primer, 50 nM of each probe and reagents supplied by TaqMan™ One-Step RT-PCR Master Mix kit (Applied Biosystem, California, USA). The sequences of primers and probes used in this study have been described elsewhere [17]. Plasmid pHE7 containing α - and β -globin cDNA, kindly provided by TJ Shen (Department of Biological Sciences, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA) [18], was used as standard for the calculation of α/β -globin mRNA ratio according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [19]. Real-time RT-PCR amplifications were conducted in triplicate using Rotor-Gene 3000 version 6.0 (Corbett Research, Sydney, New South Wales, Australia) as follows: 30 min at 48 °C for reverse transcription; 10 min at 94 °C for inactivation of reverse transcriptase and AmpliTaq Gold activation; and 35 cycles of PCR with 15 s at 94 °C for denaturation and 1 min at 58 °C for annealing/extension.

Statistical analysis

Calculation of statistical significance was performed using the Minitab software (1998; release 12.2; Minitab Inc, State College, PA, USA). Since the data did not follow a normal distribution, nonparametric statistical methods were applied for the data analysis. The Kruskal–Wallis test was used to test the differences among groups. Further testing with Mann–Whitney *U*-test was done when a significant difference was found. A *p*-value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Multiplex one-step real-time RT-PCR was used to determine the amounts of α - and β -globin mRNA in the reticulocyte blood samples. The α/β -globin mRNA ratio in each sample was then calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [19]. This procedure is based on the measurement of CT value of the sample and compared to that of standard pHE7 plasmid which contains a single copy of α - and β -globin cDNA. A known concentration of β -globin cDNA was assigned as the calibrator for calculation α/β -globin mRNA ratio of the sample. The α/β -globin mRNA ratio of the standard plasmid ranged between 0.9 and 1.1. In 14 normal subjects, the median (min–max) of α/β -globin mRNA ratio was 1.3 (0.9–2.9) (Table 2), a range of values consistent with the gene dosage.

Table 2

α/β -Globin mRNA ratio in normal and α -thalassemia subjects

Genotype	No.	Median α/β mRNA ratio (min–max)
(1) Normal control	14	1.3 (0.9–2.9) ^a
(2) One α -globin gene defects		
2.1 $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	10	0.8 (0.6–1.2)
2.2 $\alpha^{CS}/\alpha\alpha$	11	0.6 (0.3–1.1)
Subtotal	21	0.7 (0.3–1.2) ^a
(3) Two α -globin gene defects		
3.1 $\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$	23	0.5 (0.2–0.9)
3.2 $\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$	3	0.5 (0.5–0.7)
3.3 $\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}$	4	0.3 (0.3–0.8)
3.4 α^{CS}/α^{CS}	3	0.4 (0.3–0.5)
3.5 α^{CS}/α^{PS}	1	0.5
Subtotal	34	0.5 (0.2–0.9) ^a
(4) Three α -globin gene defects (Hb H disease)		
4.1 $\alpha^{SEA}/\alpha^{3.7}$	6	0.2 (0.1–0.2)
4.2 α^{SEA}/α^{CS}	10	0.2 (0.1–0.5)
4.3 α^{SEA}/α^{PS}	1	0.2
Subtotal	17	0.2 (0.1–0.5) ^a
(5) Four α -globin gene defects (Hb Bart's hydrops fetalis)		
5.1 $\alpha^{SEA}/\alpha^{SEA}$	3	0 (0–0)

^a α/β mRNA ratios were significantly different among the 4 group (*p*-value < 0.001, for both Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney *U*-test).

Seventy-five α -thalassemia samples analyzed were divided into 4 groups depending on the number of defective α -globin gene (Table 2, groups 2–5). There was a decrease in the ratios concomitant with the decrease in the numbers of functional α -globin genes. The median (min–max) α/β -globin mRNA ratio in individuals with one, two, and three α -globin gene deletion was 0.7 (0.3–1.2), 0.5 (0.2–0.9), and 0.2 (0.1–0.5), respectively, all significantly different from control value and among the groups (*p*-value < 0.001, for both Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney *U*-test). Fetal blood of Hb Bart's hydrops fetalis (group 5; 4 α -globin gene deletion) had, as expected, no transcription of α -globin gene, and thus the α/β -globin mRNA ratio was equal to zero. The presence of α^{CS} - or α^{PS} -gene gave rise to α/β -globin mRNA ratios that did not significantly differ from that due to a single α -gene deletion. Patients with Hb H disease presented with mild hypochromic and microcytic anemia (Table 1), but there was no correlation between severity of anemia, represented by Hb level, and α/β -globin mRNA ratios.

The thirty-two cases of β -thalassemia were divided into 6 groups (Table 3). The number of subjects within most categories was, however, too small for conducting meaningful statistical tests, thus the observed results were descriptively explained. Sixteen samples were heterozygous β^0 -thalassemia consisting of 9 cases of $\beta^{41/42}$ (TTCT), 5 β^{17} (AAG-TAG), and one each of β^{15} (TGG-TAG) and $\beta^{3.4}$ kb deletion. The α/β -globin mRNA ratio of this group was 2.4 (1.2–3.7) which was about two times higher than normal control. Coinheritance of α -thalassemia or Hb CS with heterozygous β^0 -thalassemia resulted in reduction of α/β -globin mRNA ratio to within the normal range (1.3 (0.9–1.5), *n*=4). Heterozygous β^+ -thalassemia (β^{-28} (A-G)) produced α/β -globin mRNA ratio (1.6 and 2.0) within normal range and coinheritance of α -thalassemia or Hb CS reduced the ratio slightly (1.3 (0.7–2.3), *n*=3). However,

Table 3
 α/β -globin mRNA ratio in β -thalassemia including coinheritance with α -thalassemia

Genotype	No.	Median α/β mRNA ratio (min–max)
(1) Heterozygous β^0 -thalassemia		
1.1 $\beta^{41/42}$ (-TTCT)	9	2.4 (1.4–3.7)
1.2 β^{17} (AAG-TAG)	5	2.4 (1.2–3.2)
1.3 β^{15} (TGG-TAG)	1	2.7
1.4 $\beta^{3.4}$ kb deletion	1	2.2
Subtotal	16	2.4 (1.2–3.7)
(2) Heterozygous β^0 -thalassemia with α -thalassemia		
2.1 $\beta^{41/42}$ (-TTCT), $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	1	1.5
2.2 $\beta^{71/72}$ (+A), $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	1	1.3
2.3 β^{17} (AAG-TAG), $\alpha^{CS}/\alpha\alpha$	1	1.2
2.4 β^{17} (AAG-TAG), $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$	1	0.9
Subtotal	4	1.3 (0.9–1.5)
(3) Heterozygous β^{+} -thalassemia (β^{-28} (A-G))	2	1.6, 2.0
(4) Heterozygous β^{+} -thalassemia with α -thalassemia		
4.1 β^{-28} (A-G), $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	3	1.3, 1.6, 2.3
4.2 β^{-28} (A-G), $\alpha^{CS}/\alpha\alpha$	1	1.1
4.3 β^{-28} (A-G), $-\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$	1	0.7
Subtotal	5	1.3 (0.7–2.3)
(5) β^0 -Thalassemia/Hb E		
5.1 β^E/β^{43} (AAG-TAG)	2	10.1, 43.3
5.2 $\beta^E/\beta^{IVS\#5}$ (G-C)	1	28.9
(6) β^0 -Thalassemia/Hb E with α -thalassemia		
6.1 $\beta^E/\beta^{41/42}$ (-TTCT), $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	1	6.1
6.2 $\beta^E/\beta^{41/42}$ (-TTCT), $\alpha^{CS}/\alpha\alpha$	1	5.0

the combination of Hb E with β -thalassemia profoundly affected α/β -globin mRNA ratio and anemia severity. Subject with a lower α/β -globin mRNA ratio had a less severe anemia than one with higher ratio (Table 1): subject BE-1 with ratio of 10.1 had a Hb level of 11.1 g/dL compared with BE-2 (α/β -globin mRNA ratio=43.3 and Hb level=7.6 g/dL) and BE-3 (α/β -globin mRNA ratio=28.9 and Hb level=6.1 g/dL). Coinheritance of α -thalassemia (BE-4) or Hb CS (BE-5) with β^0 -thalassemia/Hb E reduced α/β -globin mRNA ratio (6.1 and 5.0 respectively) and anemia severity (Hb level of 11.9 and 11.5 g/dL respectively).

Discussion

Balanced synthesis of α - and β -globin is critical to the normal development and function of red blood cells and imbalance in globin chain synthesis causes thalassemia. β -Globin is translated from mRNA transcribed from a single β -globin gene, whereas α -globin mRNA is transcribed from duplicated α -globin genes. In this study, α/β -globin mRNA ratio obtained from 14 normal subjects was consistent with that expected from the gene dosage and in agreement with previous reports of 1.2- to 2.3-fold increase of α -globin mRNA over β -globin mRNA [17,20–23]. Ratios as high as 4.2–4.6 have been reported [24,25], but these studies employed liquid hybridization techniques which are affected by variations in such factors as stringency of hybridization and specific activity of the probes employed. It is not clear whether *in situ* there is an excess of α -globin over β -globin mRNA. A confounding factor is the variation in the reticulocyte developmental stages from

which mRNA was extracted. Reticulocytes are undergoing catabolism of mRNA and ribosomes as they mature into erythrocytes within the blood circulation. In this study, blood samples were immediately processed for RNA extraction. Recent discovery of an α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP) that specifically binds unstable monomeric α -Hb and prevents its precipitation in the absence of available β -Hb subunit, suggests that there can be the presence of excess α -over β -globin chains in normal red blood cells [26].

In α -thalassemia subjects, α/β -globin mRNA ratio decreased in proportion to the number of defective α -globin gene. Decrease in α/β -globin mRNA ratios concomitant with the number of defective α -globin genes has been reported by several investigators [20,23,24], but the absolute values of the ratio given in each report are not the same, reflecting the different parameters employed in each study. Determination of α/β -globin mRNA ratio provides information regarding the number of inactivated α -globin gene. This approach should be useful to detect cases of α -thalassemia carriers.

The presence of α^{CS} -globin or α^{PS} -globin gene did not change the α/β -globin mRNA from that of deletional type of α -thalassemia (Table 2). Hb CS and Hb PS are categorized as nondeletional α -thalassemia. This has been explained by the entry of ribosomes into the 3'-untranslated region (3'-UTR) due to abolition of the normal stop codon in α^{CS} - or α^{PS} -mRNA resulting in destabilization of mRNA, which is normally protected from deadenylation and endoribonucleolytic cleavage by the presence on 3'-UTR of an RNA-protein “ α -complex” [27]. However, the presence of Hb CS and Hb PS in red blood cells, albeit in small amounts, indicates that there must be sufficient mRNA for translation of the variant α -globin chains. The pathology of red blood cells containing Hb CS or PS has been ascribed to the presence of Hb CS/Hb PS on red blood cell plasma membrane where they exert oxidative damage [28,29]. A recent report of impaired interaction of AHSP with α^{CS} - and α^{PS} -globin could also exacerbate the reduction in formation of Hb CS and Hb PS [30].

Studies of α/β -globin mRNA ratio in β -thalassemia carriers demonstrated higher values than normal control in β^0 -thalassemia carriers. These findings are consistent with the phenomenon of nonsense-mediated mRNA decay (NMD), a surveillance mechanism that selectively degrades mRNA carrying premature translation termination codons [31] (except, of course, in the case of $\beta^{3.4}$ kb deletion). All β^0 -thalassemia genes have nonsense mutations in exon 1 or exon 2, or produce an in-frame nonsense codon upstream of the last exon, which commit the affected mRNA to NMD [32]. However, the efficiency of NMD can also depend on the position of the nonsense mutation [33].

The highest α/β -globin mRNA ratios were seen in β^0 -thalassemia/Hb E and the ratios correlated with the anemia severity. This finding is in agreement with a previous report [17]. As expected the presence of deletional or nondeletional α -thalassemia in β -thalassemia carriers reduced α/β -globin mRNA ratio. When this occurs in subjects with β^0 -thalassemia/Hb E, this can result in significant amelioration of anemia. It is unclear why β^0 -thalassemia/Hb E subjects with the same

β^0 -thalassemia mutation (in the absence of α -thalassemia or high Hb F) presented with differences in anemia severity. This study clearly demonstrated that milder outcome is associated with a more normal α/β -globin mRNA ratio. A possible explanation is that this is the result of variation in alternate splicing of β^E -globin mRNA [34].

In summary, this study showed that multiplex qRT-PCR is a convenient and accurate method to measure α/β -globin mRNA ratio from α - and β -thalassemia reticulocytes. In α -thalassemia, α/β -globin mRNA ratio correlated with the number of functional α -globin genes present, whereas in β -thalassemia, the ratio provided a good indicator of disease severity.

Contributions and acknowledgments

This study was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Khon Kaen University, Thailand. SK contributed to the design of the study, data handling and writing of the manuscript. CC was responsible for the laboratory procedures and data analysis and AJ, GF, PW and SF for the design of the study. GF and SF were also responsible for α - and β -globin genotyping. PW contributed to the writing of the paper.

References

- [1] Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford: Blackwell Science; 2001.
- [2] Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia in Southeast Asia: problems and strategy for prevention and control. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992;23:647–55.
- [3] Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia: molecular biology and clinical medicine. Hemoglobin 1997;21:299–319.
- [4] Fucharoen G, Fucharoen S, Sanchaisuriya K, et al. Frequency distribution and haplotypic heterogeneity of β^E -globin gene among eight minority groups of northeast Thailand. Hum Hered 2002;53:18–22.
- [5] Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G, et al. The distribution of the Hb Constant Spring gene in Southeast Asian populations. Hum Genet 1990;84:188–90.
- [6] Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Pung-Amritt P, et al. Clinical phenotypes and molecular characterization of Hb H-Paksé disease. Haematologica 2002;87:117–25.
- [7] Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Hb Paksé [(α 2) codon 142 (TAA→TAT or Term→Tyr) in Thai patients with EA Bart's disease and Hb H disease. Hemoglobin 2002;26:227–35.
- [8] Thein SL. Pathophysiology of β -thalassemia—A guide to molecular therapies. Hematol Am Soc Hematol Educ Progr 2005:31–7.
- [9] Ireng LM, Robert A, Gala JL. Quantitative assessment of the transcriptional impact of mutations in the 3'-untranslated region of the human β -globin gene: application to the +1480 C-G mutation. Haematologica 2006;91:1563–4.
- [10] Ireng LM, Robert A, Gala JL. Quantitative assessment of human β -globin gene expression *in vitro* by TaqMan real-time reverse transcription-PCR: comparison with competitive reverse transcription-PCR and application to mutations or deletions in noncoding regions. Clin Chem 2005;51:2395–6.
- [11] Ireng LM, Heusterspreute M, Philippe M, Derclaye I, Robert A, Gala JL. Validation of a recombinant DNA construct (μ LCR and full-length β -globin gene) for quantification of human β -globin expression: application to mutations in the promoter, intronic, and 5'- and 3'-untranslated regions of the human β -globin gene. Clin Chem 2002;48:1787–91.
- [12] Fucharoen S, Fucharoen G, Fukumaki Y. Simple non-radioactive method for detecting haemoglobin Constant Spring gene. Lancet 1990;335:1527.
- [13] Fucharoen G, Fucharoen S. Rapid and simultaneous non-radioactive method for detecting α -thalassemia 1 (SEA-type) and Hb Constant Spring genes. Eur J Haematol 1994;53:186–7.
- [14] Fucharoen S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Pengjam Y. Molecular analysis of a Thai β -thalassemia heterozygote with normal haemoglobin A₂ level: implication for population screening. Ann Clin Biochem 2002;39:44–9.
- [15] Siriratmanawong N, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Simultaneous PCR detection of β -thalassemia and α -thalassemia 1 (SEA type) in prenatal diagnosis of complex thalassemia syndrome. Clin Biochem 2001;34:77–80.
- [16] Chomczynski PA. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from cell and tissue samples. Biotechniques 1993;15:532–7.
- [17] Watanapokasin Y, Winichagoon P, Fucharoen S, Wilairat P. Relative quantitation of mRNA in β -thalassemia/Hb E using real-time polymerase chain reaction. Hemoglobin 2000;24:105–16.
- [18] Shen TJ, Ho NT, Zou M, et al. Production of human normal adult and fetal hemoglobins in *Escherichia coli*. Protein Eng 1997;10:1085–97.
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 2001;25:402–8.
- [20] Hunt DM, Higgs DR, Old JM, Clegg JB, Weatherall DJ, Marsh GW. Determination of alpha thalassemia phenotypes by messenger RNA analysis. Br J Haematol 1980;45:53–64.
- [21] Hunt DM, Higgs DR, Winichagoon P, Clegg JB, Weatherall DJ. Haemoglobin Constant Spring has an unstable α chain messenger RNA. Br J Haematol 1982;51:405–13.
- [22] Huang SZ, Rodgers GP, Zeng FY, Zeng YT, Schechter AN. Diagnosis of thalassemia using cDNA amplification of circulating erythroid cell mRNA with the polymerase chain reaction. Blood 1991;78:2433–7.
- [23] Lin SF, Liu TC, Chen TP, Chiou SS, Liu HW, Chang JG. Diagnosis of thalassemia by non-isotope detection of α/β and ζ/α mRNA ratios. Br J Haematol 1994;87:133–8.
- [24] Smetanina NS, Leonova JY, Levy N, Huisman THJ. The α/β - and α_2/α_1 -globin mRNA ratios in different forms of α -thalassemia. Biochim Biophys Acta 1996;1315:188–92.
- [25] Smetanina N, Molchanova T, Huisman T. Analysis of mRNA from red blood of patients with thalassemia and hemoglobin variants. Hemoglobin 1997;21:437–67.
- [26] Kihm AJ, Kong Y, Hong W, et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free α -haemoglobin. Nature 2002;417:758–63.
- [27] Waggoner SA, Liebhaber SA. Regulation of α -globin mRNA stability. Exp Biol Med 2003;288:387–95.
- [28] Turbpaiboon C, Siritantikorn A, Thongnoppakhun W, et al. Hemoglobin Pakse: presence on red blood cell membrane and detection by polymerase chain reaction-single-strand conformational polymorphism. Int J Hematol 2004;80:136–9.
- [29] Peerapittayamongkol C, Bernini LF, Wilairat P. Presence of α^{CS} -globin on membrane of red cell containing hemoglobin Constant Spring (CS). J Sci Soc Thai 1996;22:117–20.
- [30] Turbpaiboon C, Limjindaporn T, Wongwiwat W, et al. Impaired interaction of α -haemoglobin-stabilising protein with α -globin termination mutant in a yeast two-hybrid system. Br J Haematol 2005;132:370–3.
- [31] Kuzniak HA, Maquat LE. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinical: progress and challenges. Trends Mol Med 2006;12:306–16.
- [32] Baserga SJ, Benz JEJ. Nonsense mutations in the human β -globin gene affect mRNA metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:2056–60.
- [33] Inacio A, Silva AL, Pinto J, et al. Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay. J Biol Chem 2004;279:32170–80.
- [34] Winichagoon P, Fucharoen S, Wilairat P, Chihara K, Fukumaki Y. Role of alternatively spliced β^E -globin mRNA on clinical severity of β -thalassemia/hemoglobin E disease. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995;26(Suppl 1):241–5.



วารสารเทคนิคการแพทย์

ปีที่ 34 ฉบับที่ 1 เมษายน 2549
Vol.34 (1) April 2006

Journal of the Medical Technologist Association of Thailand

การประชุมวิชาการประจำปี
สมาคมเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 30

**เทคนิคการแพทย์ : พันธกิจบูรณาการ
เพื่อการส่งเสริมสุขภาพและคุณภาพชีวิต**

**Medical Technology :
Integrative Mission for
Health Promotion and Quality of Life**

28 - 31 มีนาคม 2549

โรงแรมเจริญศรี แกรนด์ รอยัล อุดรธานี



อัตราส่วนของอัลฟา/บีตาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอ ในอัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ต่าง ๆ: การตรวจวัดด้วยเทคนิคเรียลไทม์อาร์ที-พีซีอาร์

จุฬาร ใจชื่อ^{1,2}, สุทธิพรรณ กิจเจริญ^{1,3}, กุลนภา พุ่เจริญ^{1,3}, สุพรรณ พุ่เจริญ^{1,4}
¹นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (สวป.)

คณะเทคนิคการแพทย์

³ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อัลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากการขาดหายไป (deletion) หรือมีการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนอัลฟาโกลบินทำให้มีการสร้างสายอัลฟาโกลบินได้น้อยลงจึงมีสายบีตาโกลบินส่วนเกินเหลืออยู่และก่อให้เกิดพยาธิสภาพกับเม็ดเลือดแดง การศึกษาในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของอัลฟาธาลัสซีเมียจะทำให้เข้าใจถึงพยาธิสภาพของโรคมากขึ้น ประกอบกับปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิคเรียลไทม์อาร์ที-พีซีอาร์ (real-time RT-PCR) ขึ้นมาทำให้ตรวจวัดปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอได้ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้จึงได้ตรวจวัดอัตราส่วนของอัลฟา/บีตาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอในอัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ต่างๆ ด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์อาร์ที - พีซีอาร์ (multiplex real-time RT-PCR) ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนของอัลฟา/บีตาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอในผู้ที่ไม่มียีนอัลฟาธาลัสซีเมีย (N=12) มีค่า median (interquartile rang) เท่ากับ 1.41 (1.11-1.95) กลุ่มที่มียีนอัลฟาโกลบินผิดปกติ 1 ยีน (N=16) มีค่าเท่ากับ 0.71 (0.58-0.98) กลุ่มที่มียีนอัลฟาโกลบินผิดปกติ 2 ยีน (N=17) มีค่าเท่ากับ 0.51 (0.49-0.58) และกลุ่มโรคฮีโมโกลบินเอชซึ่งมียีนอัลฟาโกลบินผิดปกติไป 3 ยีน (N=14) จะมีค่าเท่ากับ 0.17 (0.13-0.21) อัตราส่วนของอัลฟา/บีตาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอที่ได้ทุกกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนผู้ที่เป็น Hb Bart's hydrops fetalis ซึ่งสร้างสายอัลฟาโกลบินไม่ได้เลย จะได้อัตราส่วนของอัลฟา/บีตาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอเท่ากับ 0 (N=1) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ความไม่สมดุลระหว่างอัลฟาโกลบินและบีตาโกลบินในอัลฟาธาลัสซีเมียสามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่ระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ ซึ่งค่าอัตราส่วนที่ลดลงแปรตามความรุนแรงของโรค และเทคนิคเรียลไทม์อาร์ที-พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความไม่สมดุลระหว่างอัลฟาและบีตาโกลบินในผู้ป่วยได้ต่อไป



รวมบทความ

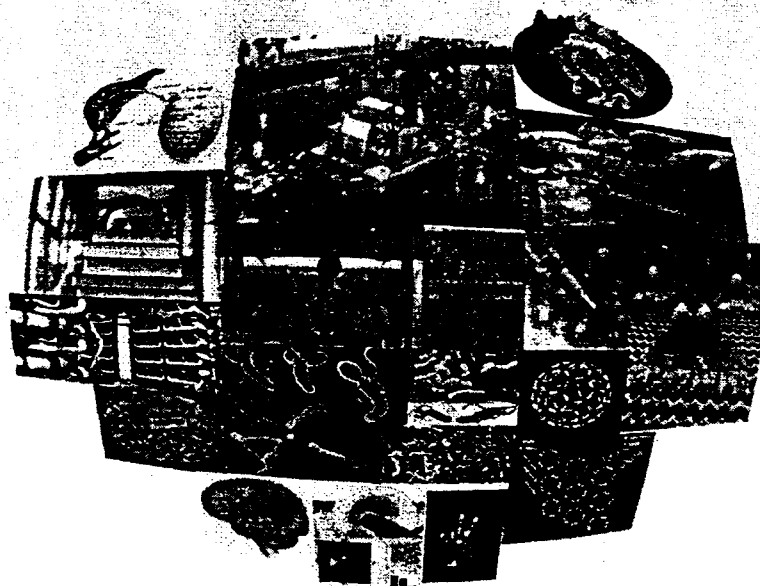


การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6

The 6th National Symposium on Graduate Research

ณ อาคารทิปโก้เบส จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

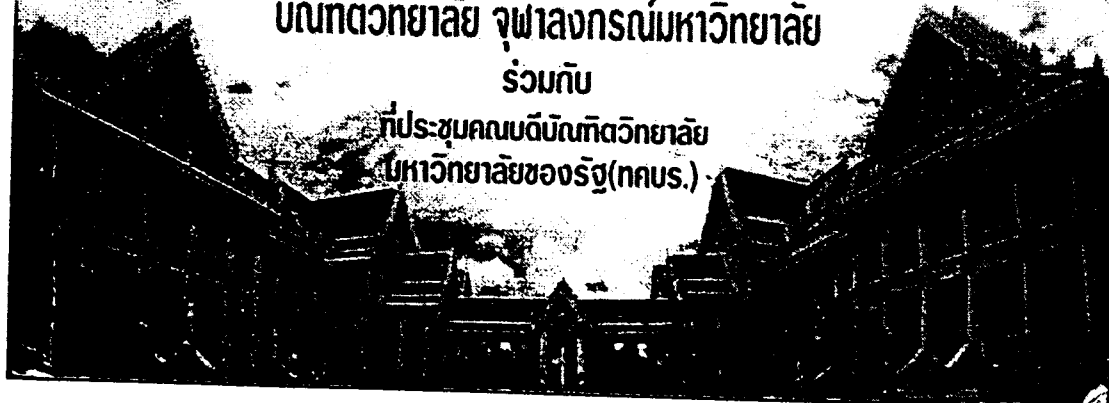
วันที่ 13-14 ตุลาคม 2549



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ร่วมกับ

ที่ประชุมคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยของรัฐ(ทคปส.)



Title THE α - β -GLOBIN MRNA RATIOS IN VARIOUS GENOTYPES OF β -THALASSEMIA

Author Chulaporn Chaisue^{1,2}

Advisor Suttiphan Kitcharoen^{2,3} Goonnapa Fucharoen^{2,1}, Arunee Jetsrisuparp⁴, Supan Fucharoen^{2,5}

Affiliation ¹Graduate Student, ²Centre for Research and Development in Medical Diagnostic Laboratories, ³Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, ⁴Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, ⁵Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

E-mail Address jub_jj@hotmail.com

Keywords α - β globin mRNA ratio, β thalassemia, real-time RT-PCR

Abstract β -Thalassemia is a group of hereditary anemias characterized by reduced (β^+ -thalassemia) or absent (β^0 -thalassemia) production of β globin chain. The excess α -globin chains precipitate in red blood cells and cause the hemolysis of red blood cells. β^0 -Thalassemia usually has more severe clinical features. It is found that red blood cells of β^0 -thalassemia contain greater amount of the excess of α -globin chains than those of β^+ -thalassemia. Moreover, the concomitance with α -thalassemia can reduce the severity of the diseases. In order to obtain more information related to the pathophysiology of disease at the mRNA level, we measured the α - β globin mRNA ratios in various genotypes of β -thalassemia using multiplex real-time RT-PCR. The result showed that the median (interquartile range) of α - β globin mRNA ratio in normal control (N=14) is 1.29 (1.10-1.70). The ratio was increased in β -thalassemia. The highest ratio was found in β -thalassemia/Hb E patients (10.14, 28.86 and 43.36, N=3), followed by β^0 -thalassemia carriers (2.44 (2.03-3.15), N=16) and β^+ -thalassemia carriers (1.98 and 1.64, N=2). The ratio was reduced when there is an interaction with α -thalassemia. The ratios in β^+ - and β^0 -thalassemia carriers with one α -globin gene defect were reduced to 1.43 (1.22-1.78), (N=4) and 1.24, 1.29, 1.45, (N=3), respectively, and those with two α -globin gene defects were closed to 1 (0.73, N=1 and 0.91, N=1, respectively). β -Thalassemia/Hb E with α -thalassemia had decreased ratio but still greater than the normal control (4.96 and 6.14, N=2). Increased of α - β globin mRNA in β -thalassemia indicates imbalance of α - and β -globin chains synthesis at mRNA level and this correlates with disease severity.