อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาเทคนิคเพื่อการตรวจวินิจฉัยชนิดของแอลฟาบวกธาลัสซีเมีย ในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช โดยใช้ SYTO9 ในเรียลไทม์ พีซีอาร์

(Technique development for genotyping of α^{+}-thalassemia in patients with Hemoglobin H disease base on Real-time PCR using SYTO9)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ดาวัลย์ ฉิมภู่

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 19 ก.ค. 2556
เลขทะเบียน 1633781
เลขเรียกหนังสือ ว QC 611 .ว.H35 ด46ร 2555

ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี 2555

การพัฒนาเทคนิคเพื่อการตรวจวินิจฉัยชนิดของแอลฟ่าบวกธาลัสซีเมีย ในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช โดยใช้ SYTO9 ในเรียลไทม์ พีซีอาร์

(Technique development for genotyping of α^{+}-thalassemia in patients with Hemoglobin H disease base on Real-time PCR using SYTO9)

ชื่อโครงการวิจัย : **การพัฒนาเทคนิคเพื่อการตรวจวินิจฉัยชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช โดยใช้ SYTO9 ในเรียลไทม์ พีซีอาร์**
(Technique development for genotyping of α^{+}-thalassemia in patients with Hemoglobin H disease base on Real-time PCR using SYTO9)

คณะผู้รับผิดชอบ

หัวหน้าโครงการวิจัย / ผู้วางแผน

รองศาสตราจารย์ ดร. ดาวัลย์ ฉิมภู่

Ph.D (Biochemistry)

โทรศัพท์ +66 5596 4789 โทรสาร +66-5596-4770

มือถือ +668 1740 3411

E-mail dawans@nu.ac.th

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 5099 00200 32 2

ตำแหน่ง : ศาตราจารย์เกียรติคุณ

คุณวุฒิ : Ph.D (Pediatric)

โทรศัพท์ : +66 5394 6480 โทรสาร +66 5335 7331

ผู้ร่วมงานวิจัย

(1) ผศ.น.สพ. ดร.พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 0124 01243 77 5

คุณวุฒิ : วท.ด. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ), สพ.บ., รป.บ.

ตำแหน่ง : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8 ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ : +66 5396 4740 โทรสาร +66 5596 4770

(2) นายธีรภัทร ศรีรัตนโชติ

เลขหมายประจำตัวประชาชน 1 6406 00086 75 8

สถานภาพ : นิสิตปริญญาเอก หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตรชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ : +668 6590 2493

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี 2555 การทำงานได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ ที่ได้เอื้อเฟื้อเรื่องการใช้ห้องปฏิบัติการ และการใช้เครื่องมือต่างๆ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความอนุเคราะห์ของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทำให้การดำเนินการวิจัย สำเร็จออกมาดังจุดประสงค์

บทคัดย่อ

โรคฮีโมโกลบิน เอ็ช เป็นแอลฟาธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงปานกลาง โดยจีโนไทป์ที่พบบ่อยเกิดจากการรวมกันของยีนแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียชนิด SEA deletion กับยีนแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิด -$\alpha^{3.7}$deletion, -$\alpha^{4.2}$ deletion หรือฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง ซึ่งชนิดหลังนี้มักทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่มีความรุนแรง ในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคเรียลไทม์ พีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบชนิดของแอลฟาบวกธาลัสซีเมีย ในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช โดยนำตัวอย่างเลือดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค มาทำการตรวจยืนยันแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมีย และตรวจแอลฟาบวกธาลัสซีเมียด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่สร้างขึ้นใหม่ 3 คู่ ตรวจไปพร้อมกันแบบแยกปฏิกิริยา (monoplex) ไพร์เมอร์ A และ C ถูกออกแบบให้สามารถจับกับบริเวณรหัสหยุดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอที่ปลาย 3' ของยีนแอลฟาโกลบิน 2 และ 1 ตามลำดับ ไพร์เมอร์ B อยู่บริเวณด้านหน้าของปลาย 5' ของยีนแอลฟาโกลบิน 1 การตรวจครั้งหนึ่งจะมีตัวอย่างดีเอ็นเอปกติ และฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง เป็นตัวอย่างควบคุม เทคนิคการวิเคราะห์คุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอที่ความละเอียดสูง (เอ็ชอาร์เอ็ม) สำหรับไพร์เมอร์ A ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง เราสามารถแยกแยะผลผลิตจากกระบวนการเรียลไทม์ พีซีอาร์ ได้จากอุณหภูมิ ณ จุดยอดกราฟของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จาก SYTO9 (melt peak) ที่หลุดออกจากการแยกสายของดีเอ็นเอสายคู่เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิหลังสิ้นสุดกระบวนการพีซีอาร์ โดยไพร์เมอร์ A, B และ C มีค่า 88.0, 84.8 และ 84.0 องศาเซลเซียสตามลำดับ ผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่มียีนแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิด -$\alpha^{3.7}$ deletion จะแสดงกราฟของไพร์เมอร์ C เท่านั้น ผู้ป่วยที่มียีน -$\alpha^{4.2}$ deletion จะแสดงกราฟของไพร์เมอร์ B และ C ส่วนผู้ป่วยที่มียีนฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง จะแสดงกราฟของไพร์เมอร์ทั้ง 3 คู่ และผลวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ชอาร์เอ็มสำหรับไพร์เมอร์ A สามารถแยกแยะยีนฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง ออกจากยีนปกติได้อย่างชัดเจน โดยจากตัวอย่างผู้ป่วย 35 รายพบว่า 19 รายมีจีโนไทป์ -$\alpha^{3.7}$/--^{SEA} 1 รายมีจีโนไทป์ –$\alpha^{4.2}$/--^{SEA} สอดคล้องกับวิธีพีซีอาร์แบบธรรมดา และ15 รายมีจีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}$/--^{SEA} ตรงกับผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (DNA sequencing) เทคนิคเรียลไทม์ พีซีอาร์ ที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว และให้ผลตรวจที่มีความถูกต้องแม่นยำ มีความเหมาะสมที่จะนำเข้ามาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของแอลฟาบวกธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ในด้านการจัดการ การควบคุมและป้องกันโรค

Abstract

Hemoglobin H (Hb H) disease is α-thalassemia intermedia. There are three common specific genotypes, namely, the two α-globin genes deletion (SEA deletion) with $-\alpha^{3.7}$ deletion, with $-\alpha^{4.2}$ deletion and with hemoglobin Constant Spring. The latter can have serious clinical manifestations like thalassemia major. This study aimed to develop the real-time PCR method to determine the α^{+}-thalassemia genotype in Hb H patients. Blood samples were collected from known Hb H patients and rechecked for α-thalassemia mutations. To detect the α^{+}-thalassemia by real-time PCR, three primer pairs were designed. Two of them were for amplifying 3' terminal DNA sequences of the HBA2 (A-primers) and HBA1 gene (C-primers). The third pair was at the 5' franking region of the HBA1 gene (B-primers). All assays, including a normal control, Hb CS control and the Hb H patients, were performed in monoplex real-time PCR. High-resolution melting (HRM) for A-primers was used to analyze the Hb CS gene. Real-time PCR assays of normal DNA samples revealed specific melt peaks corresponding to the melting temperature, with A-, B- and C- primers at 88.0, 84.8 and 84.0°C, respectively. Real-time PCR assays of Hb H with $-\alpha^{3.7}$ deletion showed only the melt peak and melting temperature of the C-primer. Hb H with $-\alpha^{4.2}$ deletion showed B- and C-primers, while Hb H with Hb CS showed A-, B- and C-primers. HRM analysis can distinguish clearly between normal and Hb CS genotypes. Among the 35 studied cases of Hb H, 19 were with $-\alpha^{3.7}$ deletion and 1 with $-\alpha^{4.2}$ deletion were in concordance with conventional PCR. 15 with Hb CS were had the same result with direct DNA sequencing. The applied real-time PCR method provides rapid, accurate, and precise determinations. It can be a reliable method for determining the type of α^{+}-thalassemia in Hb H patients, which would be beneficial for clinical management, control and prevention.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย	2
ขอบเขตโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 การดำเนินการวิจัย	10
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	10
สถานที่ทำการวิจัย	10
วิธีการดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 3 ผลการวิจัย	12
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	14
การถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	14
บทที่ 5 เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก ก : ผลการวิจัยจากทุกตัวอย่าง	19
ภาคผนวก ข : ประวัติคณะผู้วิจัย	54

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และ Melt peak ของไพร์เมอร์	12

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของยีนซูโดแอลฟา 2 ($\psi\alpha 2$) แอลฟา 2 ($\alpha 2$) และแอลฟา 1 ($\alpha 1$) และส่วนของดีเอ็นเอหน่วยที่เหมือนกัน 3 หน่วยได้แก่ X, Y และ Z ซึ่งถูกคั่นด้วยดีเอ็นเอหน่วยที่ไม่เหมือนกันได้แก่ I, II และ III	4
ภาพที่ 2 แสดงกลไกการเกิดแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิด $-\alpha^{3.7}$ deletion และชนิด $-\alpha^{4.2}$ deletion	4
ภาพที่ 3 แผนภาพไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ และกราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช แต่ละจีโนไทป์	13
ภาพที่ 4 กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ชอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ เอ	13

บทที่ 1
บทนำ

โรคฮีโมโกลบิน เอ็ช (hemoglobin H disease หรือ Hb H disease) เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดหนึ่ง ที่เกิดจากการรวมกันของแอลฟาศูนย์ (α^0) กับแอลฟาบวกธาลัสซีเมีย (α^+-thalassemia) ผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช จะมีลักษณะทางคลินิกที่แตกต่างกัน บางรายอาจมีอาการเหมือนคนปกติ บางรายมีอาการของธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงปานกลาง สำหรับโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ขั้นรุนแรงที่สุด สามารถทำให้ทารกเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือในขณะคลอด ได้แก่โรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ฮัยดรอปสุฟีทาลิส (hemoglobin H hydrops fetalis)[1] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจีโนไทป์ (genotype) ของแอลฟาบวกธาลัสซีเมียที่เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟา (α-deletion) ในโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่พบในภาคเหนือของประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด -$\alpha^{3.7}$deletion (rightward deletion) และบางส่วนเป็นชนิด -$\alpha^{4.2}$deletion (leftward deletion) และแอลฟาธาลัสซีเมียที่ไม่ได้เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาเกือบทั้งหมดเป็นฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง (hemoglobin Constant Spring: Hb CS)[2]

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การตรวจสอบจีโนไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียในผู้ป่วย โรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ นั้นมีความสำคัญในการให้คำปรึกษาแนะนำทางด้านพันธุศาสตร์แก่ผู้ป่วย[3,4] อีกทั้งยังเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับแพทย์ในการวางแผนการรักษาที่เหมาะสม[5] วิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียที่ทำกันอยู่ขณะนี้ อาศัยหลักการพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction หรือ PCR) และนำผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (gel electrophoresis)[6-12] ทำให้มีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนได้ (carryover contamination) และยังต้องใช้สีย้อมเอธิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) และเป็นพิษรุนแรง[13-15]

จากเหตุผลดังกล่าว การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบจีโนไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช 3 ชนิดได้แก่ -$\alpha^{3.7}$ deletion, -$\alpha^{4.2}$deletion และฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง ด้วยวิธีการเรียลไทม์ พีซีอาร์ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำการเพิ่มขยาย และตรวจวัดปริมาณผลผลิตจากพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ[16] โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะ และผลผลิตที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากไพร์เมอร์แต่ละคู่ จะมีคุณลักษณะการแยกของสายดีเอ็นเอ (melting curve) ที่แตกต่างกัน[17] จากนั้นจึงยืนยันความถูกต้องกับวิธีเดิมคือพีซีอาร์แบบธรรมดาและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (DNA sequencing)[18]

การนำวิธีการเรียลไทม์ พีซีอาร์ มาใช้ในการวินิจฉัยชนิดของ แอลฟาธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ทำให้ได้ผลที่รวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ ในการวินิจฉัยและวางแผนการรักษาที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยรายที่มีอาการขั้นรุนแรงของโรครวมไปถึงการให้คำปรึกษาแนะนำทางด้านพันธุศาสตร์แก่ผู้ป่วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยชนิดของแอลฟาบวกธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช โดยใช้ SYTO9 ในเรียลไทม์พีซีอาร์

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

สามารถตรวจจีโนไทป์ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช โดยใช้ SYTO9 ในเรียลไทม์ พีซีอาร์ เพื่อนำมาใช้ เป็นข้อมูลในการให้คำปรึกษาแนะนำทางด้านพันธุศาสตร์แก่ผู้ป่วย อีกทั้งยังเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับแพทย์ในการวางแผนการรักษาที่เหมาะสม

หน่วยงานและผู้ที่จะได้ประโยชน์จากผลการวิจัย

(1) หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก
- หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร
- หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่

(2) นักวิจัยได้รับประสพการณ์และพัฒนาองค์ความรู้

(3) นิสิตได้ความรู้เกี่ยวกับการทำวิจัยและสามารถศึกษาระบบการทำงานวิจัยได้ในอนาคต

ขอบเขตโครงการวิจัย

พัฒนาวิธีการตรวจชนิดของแอลฟาบวกธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช 3 ชนิด ได้แก่ $-\alpha^{3.7}$ deletion, $-\alpha^{4.2}$ deletion และฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง โดยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ความต้องการใช้ออกซิเจนที่แตกต่างกันในระหว่างพัฒนาการจากเอ็มบริโอ ฟีตัส จนเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ ทำให้มีการสังเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin: Hb) ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของพัฒนาการ อย่างไรก็ดี โครงสร้างของฮีโมโกลบินยังคงมีลักษณะทั่วไปที่เหมือนกันคือมีโครงสร้างแบบเททระเมอร์ ประกอบด้วยสายโกลบิน 2 คู่ สายโกลบินแต่ละเส้นจับอยู่กับโมเลกุลของฮีม (Heme) 1 โมเลกุล[19] [19] ฮีโมโกลบินโกเวอร์หนึ่ง ($\zeta_2\varepsilon_2$), ฮีโมโกลบินโกเวอร์สอง ($\alpha_2\varepsilon_2$) และฮีโมโกลบินพอร์ทแลนด์ ($\zeta_2\gamma_2$) เป็นชนิดที่มีการสร้างในระยะเอ็มบริโอ ฮีโมโกลบินเอฟ ($\alpha_2\gamma_2$) เป็นชนิดสำคัญใน

ระยะฟีตัส และพบบ้างในระยะเอ็มบริโอและผู้ใหญ่ ส่วนฮีโมโกลบินเอ ($\alpha_2\beta_2$) และ ฮีโมโกลบินเอสอง ($\alpha_2\delta_2$) เป็นฮีโมโกลบินที่สำคัญในวัยผู้ใหญ่[20] กลุ่มยีนแอลฟาโกลบินอยู่บนโครโมโซมที่ 16 (16p13.3) มีการเรียงตัวของยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โพลีเพบไทด์ในกลุ่มแอลฟาโกลบินจากด้านเทโลเมียร์ไปยังด้านของเซนโทรเมียร์คือ ζ-α2-α1[19,21]

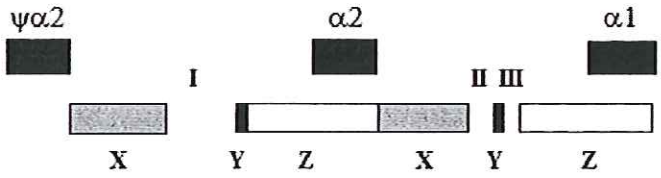
แอลฟาธาลัสซีเมีย (α-thalassemia)[19]

แอลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนแอลฟาโกลบิน ทำให้ยีนเหล่านั้นมีการสังเคราะห์สายโพลีเพบไทด์ชนิดแอลฟาโกลบินลดลง หรือไม่มีการสร้างเลย สามารถแบ่งชนิดอย่างกว้างๆ ได้เป็น 2 ชนิด ตามการสร้างสายแอลฟาโกลบิน ได้แก่ (α^0-ธาลัสซีเมีย (α^0-thalassemia) เกิดจากการที่โครโมโซมข้างนั้นไม่มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินได้เลย โฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ของแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียสามารถเขียนได้เป็น --/-- และ --/$\alpha\alpha$ ตามลำดับ และ แอลฟาบวกธาลัสซีเมีย (α^+-thalassemia) เกิดจากการที่โครโมโซมข้างนั้นมีการสร้างสายแอลฟาโกลบินในปริมาณที่ลดลง แอลฟาธาลัสซีเมียอาจเกิดจากดีลีชันของยีนแอลฟาโกลบิน หรือเกิดจากการกลายพันธุ์ (T) ซึ่งทำให้ยีนแอลฟาโกลบินยีนใดยีนหนึ่งไม่มีการทำงาน โฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดดีลีชัน (deletional α^+-thalassemia) สามารถเขียนได้เป็น -α/-α และ -α/$\alpha\alpha$ ตามลำดับ ส่วนของแอลฟาบวกธาลัสซีเมียที่ไม่ได้เกิดจากดีลีชัน (non-deletional α^+-thalassemia) สามารถเขียนได้เป็น $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ และ $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$

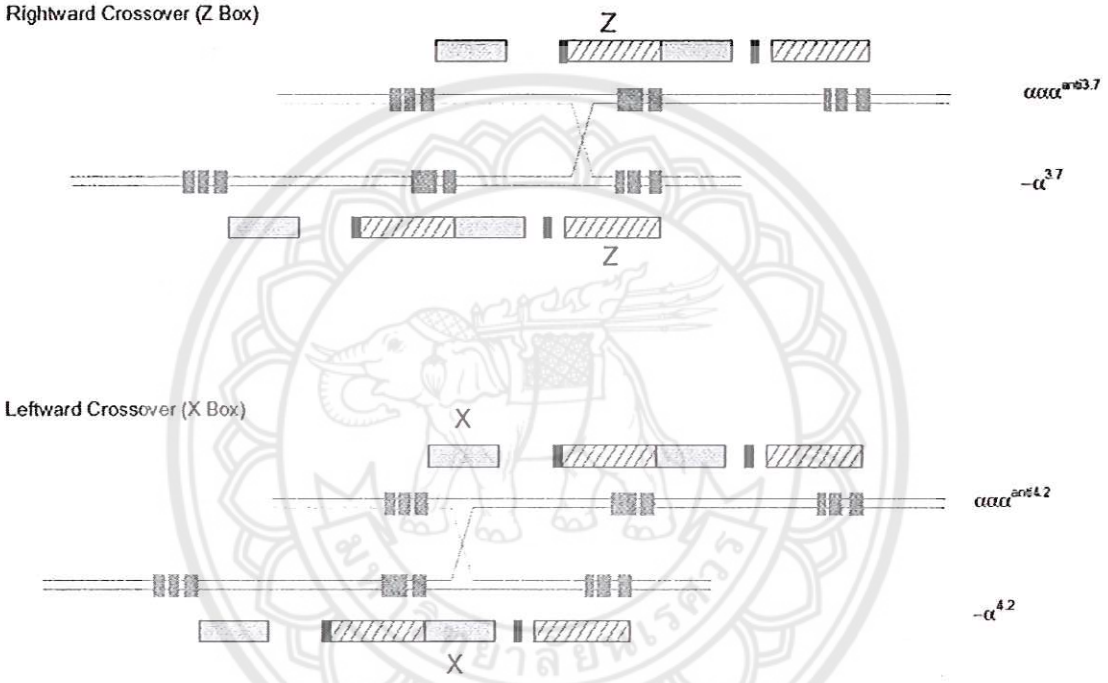
แอลฟาบวกธาลัสซีเมีย

จีโนไทป์แอลฟาบวกธาลัสซีเมียที่เกิดจากดีลีชันในโรค Hb H ที่พบในภาคเหนือของประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด -$\alpha^{3.7}$deletion (rightward deletion) และบางส่วนเป็นชนิด -$\alpha^{4.2}$deletion (leftward deletion) และแอลฟาบวกธาลัสซีเมียที่ไม่ได้เกิดจากการขาดหายไปของยีน เกือบทั้งหมดเป็นฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สปริง (hemoglobin Constant Spring หรือ Hb CS)[2]

จากการศึกษายีนแอลฟาโกลบิน พบว่ามีส่วนของดีเอ็นเอหน่วยที่เหมือนกัน (homologous subsegment) 3 หน่วยได้แก่ X, Y และ Z ซึ่งถูกคั่นด้วยดีเอ็นเอหน่วยที่ไม่เหมือนกัน (non-homologous element) ได้แก่ I, II และ III (ภาพที่ 1) การแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างส่วน Z ของยีนแอลฟา 2 กับส่วน Z ของยีนแอลฟา 1 ซึ่งอยู่ห่างกัน 3.7 กิโลเบส ทำให้เกิดแอลฟาธาลัสซีเมียชนิด –$\alpha^{3.7}$deletion[22-24] ส่วนชนิด –$\alpha^{4.2}$deletion นั้นเกิดจากการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างส่วน X ซึ่งอยู่ห่างกัน 4.2 กิโลเบส[23,24] (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของยีนซูโดแอลฟา 2 ($\psi\alpha2$) แอลฟา 2 ($\alpha2$) และแอลฟา 1 ($\alpha1$) และส่วนของดีเอ็นเอหน่วยที่เหมือนกัน 3 หน่วยได้แก่ X, Y และ Z ซึ่งถูกคั่นด้วยดีเอ็นเอหน่วยที่ไม่เหมือนกันได้แก่ I, II และ III



ภาพที่ 2 แสดงกลไกการเกิดแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิด $-\alpha^{3.7}$deletion และชนิด $-\alpha^{4.2}$deletion

ฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน (stop codon) บนยีนแอลฟา 2 ทำให้เปลี่ยนจาก TAA เป็น CAA ซึ่งเป็นรหัสของกรดอะมิโนกลูตามีน จึงทำให้มีการสร้างสายโพลีเพบไทด์ชนิดแอลฟาโกลบินจากยีนแอลฟา 2 ยาวกว่าปกติจากกรดอะมิโน ตัวสุดท้ายได้แก่อาร์จินีน (codon 141) ออกไป 31 กรดอะมิโน เป็น 172 กรดอะมิโน ทำให้ได้สายแอลฟาโกลบินที่ไม่เสถียร จึงมีฟีโนไทป์เป็นแอลฟาธาลัสซีเมีย[5,24]

โรคฮีโมโกลบิน เอ็ช[1] (Hemoglobin H disease **หรือ** Hb H disease)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ นำไปสู่ลักษณะคลินิกและโลหิตวิทยาที่แตกต่างกัน โดยปกติแล้วโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช เกิดจากการรวมกันของแอลฟาศูนย์กับแอลฟาบวกธาลัส

ซีเมีย เด็กที่อายุตั้งแต่ 6-12 เดือนขึ้นไปจนถึงวัยผู้ใหญ่ที่มีสายโกลบินที่ไม่สมดุล ก่อให้เกิดฮีโมโกลบิน เอ็ช มากกว่าร้อยละ 1 – 2 ในระบบหมุนเวียนโลหิต สามารถกล่าวได้ว่าผู้นั้นป่วยเป็นโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะทางคลินิกปกติ บางรายมีอาการของธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงปานกลาง โรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ขั้นรุนแรงที่สุด สามารถทำให้ทารกเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือในขณะคลอด ได้แก่โรคฮีโมโกลบินเอ็ช ฮัยดรอปสฺฟีทาลิส[25,26]

พยาธิสรีรวิทยา[1,5]

ในการเกิดโรฮีโมโกลบิน เอ็ช เอ็มฮาร์เอ็นเอของแอลฟาโกลบิน และสายโพลีเพบไทด์ชนิดแอลฟาโกลบินจะมีปริมาณลดต่ำลง ทำให้สัดส่วนของ เอ็มอาร์เอ็นเอของแอลฟาโกลบินต่อบีตาโกลบินต่ำกว่า 0.5 และสัดส่วนของการสังเคราะห์สายแอลฟาโกลบินต่อโพลีเพบไทด์ชนิดบีตาโกลบินจะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 0.7[4] ในระหว่างพัฒนาการของฟีตัส โพลีเพบไทด์ชนิดแกมมาโกลบินที่มากเกินพอจะรวมตัวกันเป็นฮีโมโกลบินบาร์ทสฺ (γ_4) ในวัยผู้ใหญ่โพลีเพบไทด์ชนิดบีตาโกลบินที่มากเกินพอจะรวมตัวกันเป็นฮีโมโกลบิน เอ็ช (β_4) โฮโมเททระเมอร์ (homotetramer) เหล่านี้จะมีความสามารถในการจับกับออกซิเจนสูง มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลของฮีมต่ำ และไม่สามารถนำออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

ฮีโมโกลบิน เอ็ช เป็นโครงสร้างที่ไม่เสถียร เมื่อถูกออกซิไดส์จะตกตะกอนภายในเซลล์ (intracellular precipitate) ในระยะที่มีการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง ตะกอนเหล่านี้จะเป็นเหตุให้เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนถูกทำลายและมีการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีประสิทธิภาพ แต่สาเหตุสำคัญของการเกิดโลหิตจางในโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช คือการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ตะกอนของฮีโมโกลบิน เอ็ช ในเม็ดเลือดแดงในระบบหมุนเวียนโลหิตจะเข้าเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดความผิดปกติ และเซลล์เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้น เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบิน เอ็ช จะไม่ยืดหยุ่น และมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่คงรูปร่างมากว่าปกติ โดยเฉพาะในผู้ที่มีฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง เยื่อหุ้มเซลล์จะยิ่งมีความแข็งมากขึ้น นั่นทำให้เกิดความหน่วงในการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดแดงในหลอดเลือดที่มีขนาดเล็ก และชักนำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงโดยกระบวนการจับกินของระบบภูมิคุ้มกัน (erythrophago-cytosis)

การมีไข้ สามารถเร่งให้เกิดอินคลูชัน (inclusion) จากฮีโมโกลบิน เอ็ช ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงนำไปสู่การเกิดภาวะวิกฤตจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลายฉับพลัน (acute hemolytic crisis) และการลดลงของฮีโมโกลบินทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยบางราย ความผิดปกติที่เกิดขึ้นบนเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะการมีอยู่มากของฟอสฟาทิดิลเซอรีน (phosphatidylserine) ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดแดงในไขกระดูกถูกทำลายจากกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) และเกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติหรือเสื่อมสภาพในระบบหมุนเวียนโลหิตโดยมาโครฟาจ (macrophage) นอกจากนี้ อิมมูโนโกลบูลิน จี (immunoglobulin G: IgG) และองค์ประกอบร่วมอื่นๆ บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ด

เลือดแดงก็มีส่วนในการชักนำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงโดยกระบวนการจับกินของระบบภูมิคุ้มกันด้วยเช่นกัน

โดยปกติโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่โครโมโซมข้างหนึ่งเป็นแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่ได้เกิดจากดีลีชัน (--/$\alpha^T\alpha$) จะมีความรุนแรงของโรคมากกว่าชนิดที่เกิดจากดีลีชัน (--/-α) [4,5,27,28] สาเหตุหนึ่งซึ่งสามารถใช้อธิบายความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันนี้คือ การที่ยีนแอลฟา 2 ปกติสามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินโพลีเพบไทด์ได้มากกว่ายีน แอลฟา 1 ถึง 2.5 เท่า สมมุติให้ยีน แอลฟา 1 สามารถสร้างโพลีเพบไทด์สาย แอลฟาโกลบินได้ 1 หน่วย เพราะฉะนั้นยีน แอลฟา 2 จึงสามารถสร้างได้ 2.5 หน่วย รวมกันเป็น 3.5 หน่วย การเกิดการกลายพันธุ์ ที่ยีน แอลฟา 2 เช่นในฮีโมโกลบิน คอยสแตนท์ สปริง ทำให้เหลือเอ็มอาร์เอ็นเอของโกลบินสายแอลฟาที่ปกติจากยีน แอลฟา 1 ในปริมาณ 1 หน่วยเท่านั้น แต่ในแอลฟาบวกธาลัสซีเมียที่เกิดจากดีลีชัน เช่นชนิด -$\alpha^{3.7}$ deletion กลับพบว่ามีการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอของโกลบินสายแอลฟาจากยีนที่เหลือ 2 หน่วย

ลักษณะทางคลินิก[1,5]

โดยทั่วไปผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช มักมีโลหิตจางเล็กน้อย โดยมีระดับของฮีโมโกลบินต่ำกว่าในคนปกติโดยเฉลี่ย ประมาณ 2 กรัมต่อเดซิลิตร ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (mean corpuscular volume: MCV) และปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (mean corpuscular hemoglobin: MCH) ต่ำกว่าในคนปกติ แต่มีจำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell count: RBC count) มากกว่า พบว่าร้อยละ 25 ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่เกิดจากดีลีชัน และร้อยละ 50 ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ชนิดที่ไม่ได้เกิดจากดีลีชันในประเทศไทย มีภาวะโลหิตจางที่รุนแรงจำเป็นต้องได้รับการถ่ายเลือด ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยในกลุ่มนี้เสี่ยงต่อภาวะเหล็กเกิน (iron overload)

นอกจากนี้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ยังมีอาการซีด (pallor) และเหลือง (Jaundice) ตับม้ามโต (hepatospleno-megaly) พบว่าผู้ป่วยซึ่งอาจมากถึงร้อยละ 40 มีนิ่วอุดตันในระบบท่อน้ำดี ผู้ป่วยประมาณ 1 ใน 3 มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกที่เป็นลักษณะเฉพาะของโรคธาลัสซีเมีย พบว่าเด็กที่เป็นโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ในประเทศไทยมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ

จีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดฟีโนไทป์ที่มีความหลากหลาย ทั้งนี้อาจได้รับอิทธิพลจากยีนส่วนอื่นๆ ที่ยังไม่ได้มีการศึกษา และ/หรือจากปัจจัยภายนอก ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช

การวินิจฉัยโรค[5]

โดยปกติฮีโมโกลบิน เอ็ช จะตกตะกอนเป็นอินคลูชันในเม็ดเลือดแดง สามารถตรวจสอบได้โดยการย้อมสีและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช จะติดสีจาง และมีขนาดเล็กกว่าปกติ การตรวจสอบชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีฮีโมโกลบินอิเล็กโทรฟอรีซิส (hemoglobin electrophoresis), ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing: IEF) และไฮเพอร์-

ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟี (high-performance liquid chromatography: HPLC) เพื่อหาร้อยละของฮีโมโกลบิน เอ็ช ซึ่งมักพบอยู่ระหว่างร้อยละ 5-30 และมีฮีโมโกลบิน เอ2 ต่ำกว่าปกติร้อยละ 1-2

การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ นั้นมีความสำคัญในการให้คำปรึกษาทางด้านพันธุศาสตร์แก่ผู้ป่วย และการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด ปัจจุบันนิยมตรวจชนิดของดีลีชันที่ทราบตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของยีน โดยอาศัยหลักการของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมคร่อมบริเวณที่มีการขาดหายไปของยีน โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ พีซีอาร์ (polymerase chain reaction หรือ PCR) และการใช้วิธีเซาเทิร์นบล็อท (Southern blot) ในการหาบริเวณที่มีการขาดหายไปของยีน

ในการหาชนิดของการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียว มักใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทโดยตรง (DNA sequencing) นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีการรีเวอร์ส-ด็อทบลอท (reverse dot blot) โดยอาศัยหลักการเข้าคู่กันของโพรบ (probe) ที่มีความจำเพาะ และวิธีแอมพลิฟิเคชันรีแฟรคทอรีมิวเทชันซิสเท็ม (amplification refractory mutation system: ARMS) ซึ่งอาศัยพื้นฐานของพีซีอาร์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจชนิดของแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR)[29]

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ คือกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการอย่างทวีคูณ โดยใช้นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่เรียกว่าไพรเมอร์ (primer) 2 สาย ที่มีความจำเพาะในการกำหนดขอบเขตของบริเวณที่ต้องการ

ในแต่ละรอบของกระบวนการพีซีอาร์เริ่มด้วยการทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางโมเลกุล (denaturation) จากดีเอ็นเอเกลียวคู่ (DNA double helix) เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (DNA single strand) โดยใช้ความร้อนสูงประมาณ 94°C เป็นเวลา 30 วินาทีถึง 5 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ 40°C ถึง 65°C เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับDNAแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม หลังจากนั้น เพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปที่ประมาณ 72°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทาง 5' ไป 3' เป็นอันสิ้นสุดกระบวนการ 1 รอบ ซึ่งแต่เดิมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละรอบใช้วิธีย้ายหลอดปฏิกิริยา (reaction tube) สลับไปมาในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิต่างๆ แต่ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับกระบวนการพีซีอาร์หรือเทอร์โมไซเคลอร์ (thermocycler) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของปฏิกิริยาได้อย่างแม่นยำ

การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์โดยปกติมักทำโดยวิธีการแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจลหรือ เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

ที่สามารถแทรกตัว (intercalate) อยู่ระหว่างเอ็นเอสายคู่ เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลท (ultraviolet: UV) จะทำให้เห็นเป็นแถบของดีเอ็นเอเรืองแสง

เรียลไทม์ พีซีอาร์ (Real-time PCR)

เรียลไทม์ พีซีอาร์ เกิดจากการพัฒนาเครื่องเทอร์โมไซเคลอร์ ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่องมือแบบเรียลไทม์ โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสง และระบบตรวจสอบการเรื่องแสงของผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ และการพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหาผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์โดยการใช้สารฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence reporters) ดังนั้น การทำเรียลไทม์ พีซีอาร์ จึงเป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ[16]

การใช้สารสี SYTO9[30] เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณผลผลิตจากกระบวนการเรียลไทม์ พีซีอาร์ SYTO9 เป็นสารสีย้อมประเภทเรืองแสง (fluorescent dye) ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับดีเอ็นเอสายคู่ และเมื่อได้รับการกระตุ้น (excite) จากแหล่งกำเนิดแสงในเครื่องเรียลไทม์เทอร์โมไซเคลอร์ จะมีการคายพลังงาน (emission) ในรูปของการเรืองแสงเมื่อเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่แล้วเท่านั้น ในระหว่างการทวีจำนวนของการทำเรียลไทม์ พีซีอาร์ จุดเริ่มต้นของสัญญาณการเรืองแสง (fluorescence signal) จะถูกกำหนด ณ จุดที่สัญญาณจากทุกตัวอย่างสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ เรียกจุดนั้นว่าเทรชโฮลด์ (threshold) ซึ่งถูกคำนวณในรูปของฟังก์ชันของสัญญาณการเรืองแสงพื้นหลังทั้งหมด (background fluorescence) สัญญาณจากตัวอย่างวิเคราะห์จะถูกตรวจวัดและแสดงในรูปแบบของกราฟ เมื่อสัญญาณจากตัวอย่างวิเคราะห์สูงกว่าสัญญาณจากการเรืองแสงพื้นหลังอย่างมีนัยสำคัญ ณ ตำแหน่งที่กราฟตัดเส้นเทรชโฮลด์นี้ เรียกว่าไซเคิลเทรชโฮลด์เขียนแทนด้วย C_t (cycle threshold) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับดีเอ็นเอเริ่มต้นทั้งหมดในปฏิกิริยา เราเราจึงสามารถใช้ค่า C_t ในการเปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอจากตัวอย่างกับดีเอ็นเออ้างอิงได้[31,32]

เครื่องเทอร์โมไซเคลอร์จะทำการวิเคราะห์ผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ โดยค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละน้อย และตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงอย่างต่อเนื่อง เมื่อถึงอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการแยกสายของดีเอ็นเอสายคู่ประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมดหรือ T_m (melting temperature) ทำให้ SYTO9 หลุดออก สัญญาณการเรืองแสงจึงลดลงอย่างฉับพลัน เครื่องจะเก็บข้อมูลและนำมาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงในขณะเพิ่มอุณหภูมิ (melting curve) และซอฟแวร์ของเครื่องจะนำข้อมูลนั้นมาสร้างเป็นกราฟระหว่างสัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงต่อเวลา (-dF/dT) ในขณะที่มีการเพิ่มอุณหภูมิ (melting peak) ผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ ที่เกิดขึ้นจากไพร์เมอร์แต่ละคู่ จะมีคุณลักษณะการแยกของสายดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความยาวและปริมาณกวานีน (Guanine: G) และไซโตซีน (Cytosine: C) ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้เพื่อแยกดีเอ็นเอผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ออกจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนได้[17,32]

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)[33,34]

โดยปกติดีเอ็นโพลีเมอเรสจะทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการเติมดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxy-nucleotide: dNTP) ชนิดต่างๆ เข้าไปที่ตำแหน่ง 3' ของไพรเมอร์ โดยจะสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphor-dieater bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ กับหมู่ฟอสเฟต (phosphate group) ที่ปลาย 5' ของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่ที่นำมาต่อ ซึ่งลำดับในการสังเคราะห์จะเป็นคู่สม (comple-mentary) กับดีเอ็นเอแม่แบบ หากมีการเติมไดดีออกซินิวคลีโอไทด์ (dideoxynucleotide: ddNTP) ลงไปในปฏิกิริยา ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสสามารถนำไดดีออกซินิวคลีโอไทด์นี้ เข้าไปต่อกับสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างการสังเคราะห์ เนื่องจากที่ตำแหน่ง 3' ของไดดีออกซินิวคลีโอไทด์นั้นไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล จึงทำให้การสังเคราะห์หยุดลง ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ถูกคิดค้นโดย Sanger และคณะ (1977)[35]

ปัจจุบันได้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกทำในเครื่องอัตโนมัติ มีการติดสลากไดดีออกซินิวคลีโอไทด์โดยใช้สารเรืองแสงที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ จะคายพลังงานในรูปของแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน เพื่อแยกแยะชนิดของ A, C, G และ T โดยแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ต่างๆ กันในช่องทางเดียวในหลอดคาปิลลารี (capillary) จากนั้นเครื่องจะทำการตรวจจับการเรืองแสงที่เกิดขึ้นจากไดดีออกซีนิวคลีโอไทของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแต่ละขึ้น และแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ออกมาในรูปแบบของโครมาโทแกรม (chromatogram)

บทที่ 2
การดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. QIAamp® DNA Blood Mini Kit
2. CFX96 Real-Time PCR Detection System
3. ABI Prism® BIgDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
4. ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
5. ปิเปตและทิป
6. น้ำยาสำหรับปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์
7. ไพร์เมอร์

สถานที่ทำการวิจัย

1. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตรมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. นำตัวอย่างเลือดที่เหลือใช้ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช จากคลินิกกุมารเวชและธาลัสซีเมีย (Pediatric Thalassemia Clinic) โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จำนวน 35 ราย มาสกัดดีเอ็นเอด้วย ชุดสกัด QIAamp® DNA Blood Mini Kit สำหรับการทำเรียลไทม์ พีซีอาร์

2. นำตัวอย่างทั้งหมด มาทำการตรวจยืนยันแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียชนิด SEA deletion โดยเรียลไทม์ พีซีอาร์ ตามวิธีของ Pornprasert, S และคณะ (2007)[13]

3. การทำเรียลไทม์ พีซีอาร์

2.1 ออกแบบไพรเมอร์จาก Primer-BLAST (NCBI) ให้มีขนาดประมาณ 80-200 คู่เบส และมีความจำเพาะกับ 3 บริเวณได้แก่ บริเวณส่วนท้ายของยีนแอลฟา 2 (ไพร์เมอร์ A) บริเวณดีเอ็นเอหน่วยที่ไม่เหมือนกัน II หรือ III ที่อยู่ด้านหน้าปลาย 5' ของยีนแอลฟา 1 (ไพร์เมอร์ B) และบริเวณส่วนท้ายของยีนแอลฟา 1 (ไพร์เมอร์ C) ไพรเมอร์ทั้งหมดถูกสังเคราะห์โดยบริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำเรียลไทม์ พีซีอาร์ โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำยาสำหรับปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์ ตามคำแนะนำการใช้ร่วมกับ Platinum® *Taq* ดีเอ็นเอ โพลีเมอร์เรส (Invitrogen, California, USA)[36] ดังนี้

- พีซีอาร์บัฟเฟอร์ 1X
- ดีอ็อกซีไรโบนิวคลิโอไทด์แต่ละชนิด 0.2 มิลลิโมลลาร์
- แม็กนีเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิโมลลาร์
- ไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลลาร์
- Platinum® *Taq* ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส 1 ยูนิต
- สารสี SYTO9 2 ไมโครโมลลาร์[37]

2.3 ตรวจสอบดีเอ็นเอของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช แต่ละตัวอย่าง โดยเครื่องเรียลไทม์ พีซีอาร์ CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad) ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่แบบแยกกัน (monoplex) ตามด้วยขั้นตอนของการหาคุณลักษณะการแยกของสายดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 76°C ไปจนถึง 95°C จากนั้นเครื่องจะประมวลผลให้ค่า melt peak ซึ่งใช้แยกความแตกต่างของผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการพีซีอาร์ ในการตรวจทุกครั้งจำเป็นต้องมีตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ชนิดที่มีฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง และของพาหะฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง เป็นตัวอย่างควบคุม

4. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 หากมีผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ใช้โปรแกรมวิเคราะห์คุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอที่ความละเอียดสูงหรือเอ็ชอาร์เอ็ม (High-Resolution Melting หรือ HRM) สำหรับไพร์เมอร์ A เพื่อแยกแยะความแตกต่างระหว่างยีนปกติ กับยีนฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง

4.2 หากมีผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ที่เกิดจากไพรเมอร์ B และ C แสดงว่าผู้ป่วยมียีนแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิด -$\alpha^{4.2}$deletion

4.3 หากมีผลผลิตจากกระบวนการPCR ที่เกิดจากไพรเมอร์ C เท่านั้น แสดงว่าผู้ป่วยมียีนแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิด -$\alpha^{3.7}$deletion

5. ตรวจยืนยันตัวอย่างที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นแอลฟาบวกธาลัสซีเมียที่เกิดจากดีลีชัน ด้วยวิธีพีซีอาร์แบบธรรมดาในเครื่อง CFX96 Real-Time PCR Detection System เปรียบเทียบกับผลจากเรียลไทม์ พีซีอาร์ และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงในตัวอย่างที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ชนิดที่มีฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง เปรียบเทียบกับผลจากเรียลไทม์ พีซีอาร์ และเอ็ชอาร์เอ็ม เพื่อยืนยันความถูกต้อง โดยเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์จาก ABI Prism® BIgDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องอัตโนมัติ ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

บทที่ 3
ผลการวิจัย

1. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และ Melt peak ของไพร์เมอร์

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลิโอไทด์	Melt peak
A-Forward	TCCTGGCTTCTGTGAGCACCGT	88.0
A-Reverse	ACCAGGAAGGGCCGGTGCAAG	
B-Forward	CACCTCCATTCTCCAACCACAG	84.8
B-Reverse	AGTCTGGAGGTGTGGACGAGGC	
C-Forward	ACGCCTCCCTGGACAAGTTC	84.0
C-Reverse	AGAAGCATGGCCACCGAGGCTC	

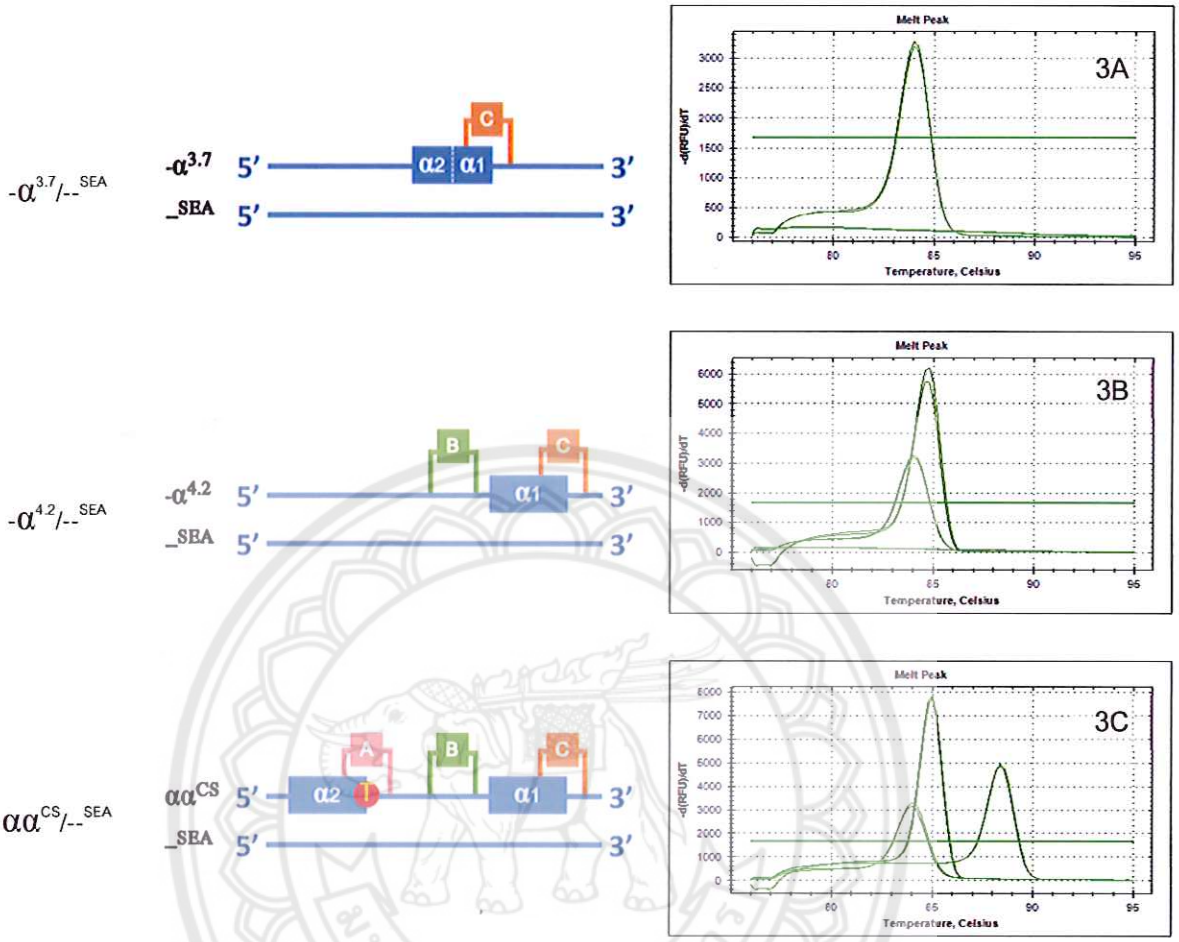
2. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำเรียลไทม์ พีซีอาร์

ปฏิกิริยาเรียลไทม์ พีซีอาร์ เริ่มจากการให้ความร้อน 95°C เป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที เพื่อเริ่มต้นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอเกิดการแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นตามด้วยการให้ความร้อน 95°C 15 วินาที 64°C 15 วินาที และ 72°C 30 วินาที เป็นจำนวน 40 รอบ

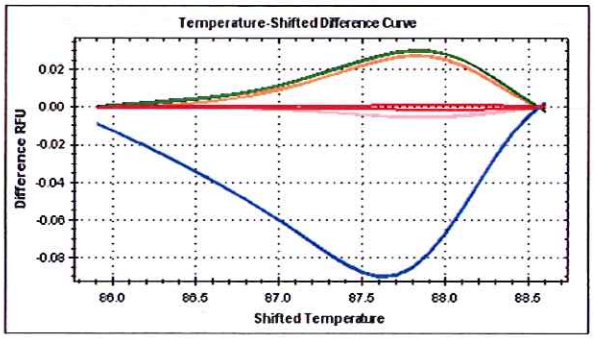
3. ผลจากการตรวจด้วยเรียลไทม์ พีซีอาร์

จากตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช 35 ราย พบว่าทุกตัวอย่างเป็นพาหะของ SEA deletion มีจีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$ 19 ราย และจีโนไทป์ $-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$ 1 แสดงในภาพที่ 3A และ 3B ตามลำดับ ซึ่งผลการตรวจด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์นี้สอดคล้องกับวิธีพีซีอาร์แบบธรรมดา และพบจีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$ 15 ราย แสดงในภาพที่ 3C และ 4 ซึ่งตรงกับผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง

จีโนไทป์	ไพรเมอร์ที่สามารถทำงานได้	กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



ภาพที่ 3 แผนภาพไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ และกราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช แต่ละจีโนไทป์ (3A) ผลจากการตรวจในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่มีจีโนไทป์ -$\alpha^{3.7}$/--^{SEA} (3B) ผลจากการตรวจในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่มีจีโนไทป์ –$\alpha^{4.2}$/--^{SEA} และ (3C) จากการตรวจในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่มีจีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}$/--^{SEA}



- ตัวอย่างความคุมที่มียีนปกติ ฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง
- ตัวอย่างควบคุมของพาหะฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง
- ตัวอย่างควบคุมของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่มียีนฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง
- ตัวอย่างศึกษาที่เป็นโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ที่มียีนฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง
- ตัวอย่างศึกษาที่มียีนปกติ

ภาพที่ 4 กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

บทที่ 4
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินนั้น ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากมีชุดของยีนซ้ำกันในหลายบริเวณ ทำให้อาจเกิดปัญหาในเรื่องของผลผลิตจากพีซีอาร์ที่ไม่ได้มาจากยีนเป้าหมายจริง (Non-specific product) การใช้ไพร์เมอร์ทั้ง 3 คู่ ตรวจไปพร้อมกันแบบแยกปฏิกิริยา จำเป็นต้องให้ไพร์เมอร์แต่ละคู่มีอุณหภูมิที่ทำให้มันสามารถจับกับสายดีเอ็นเอ (Annealing temperature) ใกล้เคียงกันที่สุด อย่างไรก็ดี เราสามารถตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจาพีซีอาร์ได้จากคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงสามารถตรวจจับผลผลิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย รวมถึงการปนเปื้อนแม้เพียงเล็กน้อยได้อีกด้วย

การวิเคราะห์ด้วยวิธีการเอ็ชอาร์เอ็ม เป็นการใช้ซอฟท์แวร์ในการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างของคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถแยกแยะมิวเทชันได้ แม้ว่าจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเพียงลำดับเดียวก็ตาม ดังเช่นในการทดลองนี้ สามารถใช้วิธีเอ็ชอาร์เอ็มในการแยกแยะมิวเทชันของฮีโมโกลบิน คอนสแตนท์ สปริง ออกจากยีนปกติได้อย่างชัดเจน

เทคนิคเรียลไทม์ พีซีอาร์ ร่วมกับเอ็ชอาร์เอ็ม ที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว และให้ผลตรวจที่มีความถูกต้องแม่นยำ มีความเหมาะสมที่จะนำเข้ามาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของแอลฟาบวกธาลัสซีเมียในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบิน เอ็ช ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ในด้านการจัดการ การควบคุมและป้องกันโรค

การถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

- ดำเนินการเผยแพร่ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยผ่านทาง website ที่จัดทำขึ้นโดยผู้วิจัย
- นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมทางวิชาการระดับประเทศ อย่างน้อย 1 ครั้ง
- เผยแพร่ผลงานวิจัยโดยตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ อย่างน้อย 1เรื่อง

บทที่ 5
เอกสารอ้างอิง

1. Higgs DR. The pathophysiology and clinical features of α thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, eds. Disorders of Hemoglobin; Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2 ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2009:266-89.

2. Charoenkwan P, Taweephon R, Sae-Tung R, Thanarattanakorn P, Sanguansermsri T. Molecular and Clinical Features of Hb H Disease in Northern Thailand. Hemoglobin 2005;29:133-40.

3. Waye JS, Eng B, Patterson M, et al. Hemoglobin H (Hb H) disease in Canada: molecular diagnosis and review of 116 cases. Am J Hematol 2001;68:11-5.

4. Kanavakis E, Papassotiriou I, Karagiorga M, et al. Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. Br J Haematol 2000;111:915-23.

5. Chui DHK, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. Blood 2003;101:791-800.

6. Bowden DK, Vickers MA, Higgs DR. A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of alpha thalassaemia. Br J Haematol 1992;81:104-8.

7. Baysal E, Huisman TH. Detection of common deletional alpha-thalassemia-2 determinants by PCR. Am J Hematol 1994;46:208-13.

8. Sanguansermsri T, Phumyu N, Chomchuen S, Steger HF. Screening for alpha-thalassemia-1 heterozygotes in expecting couples by the combination of a simple erythrocyte osmotic fragility test and a PCR-based method. Community Genet 1999;2:26-9.

9. Liu YT, Old JM, Miles K, Fisher CA, Weatherall DJ, Clegg JB. Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. Br J Haematol 2000;108:295-9.

10. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. Blood 2000;95:360-2.

11. Tangvarasittichai O, Jeenapongsa R, Sitthiworanan C, Sanguansermsri T. Laboratory investigations of Hb Constant Spring. Clin Lab Haematol 2005;27:47-9.

12. Kantamool C. Molecular mutation and incidence of the non-Southeast Asian deletion type of alpha-thalassemia-1 in patients with hemoglobin H disease. Chiangmai: Chiangmai University; 2003.

13. Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansermsri T. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. Eur J Haematol 2008;80:510-4.

14. Sun C-F, Lee C-H, Cheng S-W, et al. Real-time quantitative PCR analysis for α-thalassemia-1 of Southeast Asian type deletion in Taiwan. Clinical Genetics 2001;60:305-9.

15. Jingzhong L, Mei Y, Zhangyong W, Lirong W, Yan Z, Bai X. Molecular diagnosis of α-thalassemia by combining real-time PCR with SYBR Green1 and dissociation curve analysis. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine 2006;148:6-12.

16. Shipley GL. An introduction to real-time PCR. In: Dorak MT, ed. Real-time PCR: Taylor & Francis Group; 2006:1-37.

17. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. Analytical Biochemistry 1997;245:154-60.

18. Old J, Traeger-Synodinos J, Petrou M, Angastiniotis M. Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders. Nicosia, Cypus: Thalassaemia International Federation; 2005.

19. Higgs D, Weatherall D. The Alpha Thalassaemias. Cellular and Molecular Life Sciences 2009;66:1154-62.

20. Steinberg MH, Nagel RL. Hemoglobins of the Embryo, Fetus, and Adult. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, eds. Disorders of Hemoglobin; Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2 ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2009:119-35.

21. Waye JS, Chui DH. The alpha-globin gene cluster: genetics and disorders. Clin Invest Med 2001;24:103-9.

22. Higgs DR, Hill AV, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB. Independent recombination events between the duplicated human alpha globin genes; implications for their concerted evolution. Nucleic Acids Res 1984;12:6965-77.

23. Embury SH, Miller JA, Dozy AM, Kan YW, Chan V, Todd D. Two different molecular organizations account for the single alpha-globin gene of the alpha-thalassemia-2 genotype. J Clin Invest 1980;66:1319-25.

24. Higgs DR. The Molecular Basis of α thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, eds. Disorders of Hemoglobin; Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2 ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2009:241-65.

25. Chan V, Chan TK, Liang ST, Ghosh A, Kan YW, Todd D. Hydrops fetalis due to an unusual form of Hb H disease. Blood 1985;66:224-8.

26. Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, et al. Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. Br J Haematol 2001;115:72-8.

27. Chen FE, Ooi C, Ha SY, et al. Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients. N Engl J Med 2000;343:544-50.

28. Laosombat V, Viprakasit V, Chotsampancharoen T, et al. Clinical features and molecular analysis in Thai patients with HbH disease. Ann Hematol 2009;88:1185-92.

29. Pelt-Verkuil Ev, Belkum Av, Hays JP. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification: Springer; 2008.

30. Monis PT, Giglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. Anal Biochem 2005;340:24-34.

31. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol 2002;30:503-12.

32. Ponchel F. Real-time PCR using SYBR Green. In: Dorak MT, ed. Real-time PCR: Taylor & Francis Group; 2006:139-54.

33. Biosystems A. Automated DNA Sequencing Chemistry Guide. USA: Applied Biosystems; 2000.

34. Primsorn C. Detection of molecular mutation in β-thalassemia majors by direct β-globin gene sequencing [Master thesis]. Chiangmai: Chiangmai University; 2003.

35. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:5463-7.

36. Invitrogen. Manual for Platinum® Taq DNA Polymerase. In. California, USA: Life Technologies; 2010.

37. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. Nucleic Acids Res 2007;35:e127.

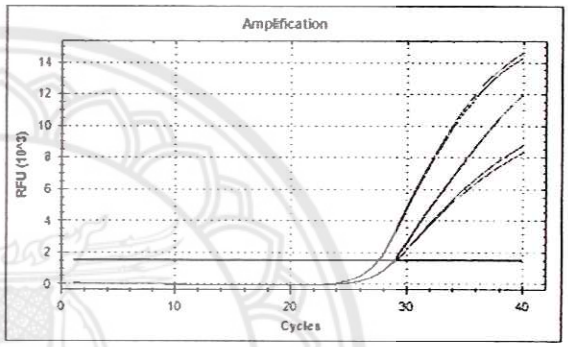
ภาคผนวก ก : ภาพผลการทดลองทั้ง 40 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง H1

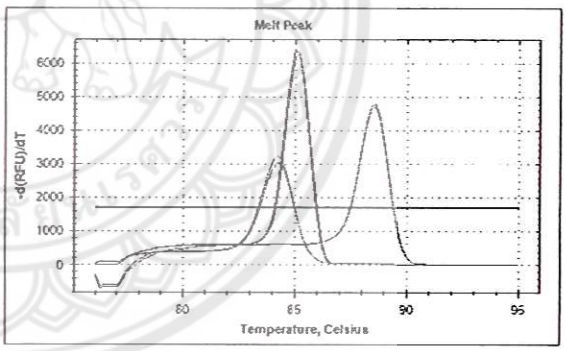
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

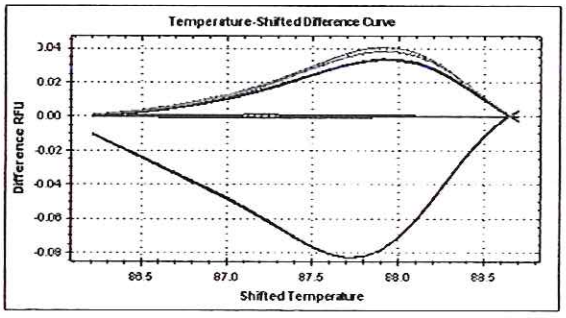
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A



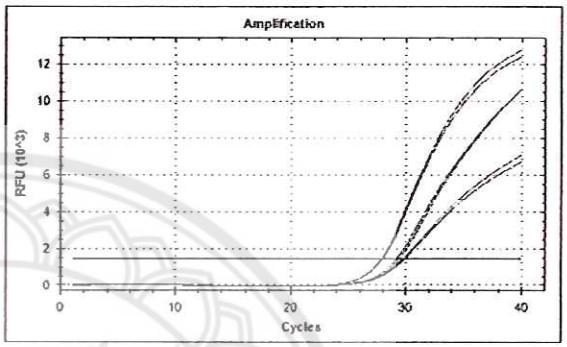
สำนักหอสมุด

ตัวอย่าง H2

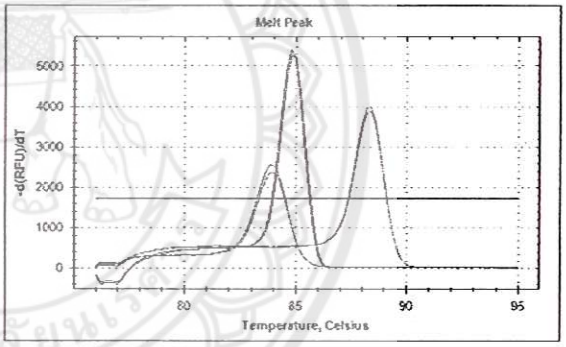
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

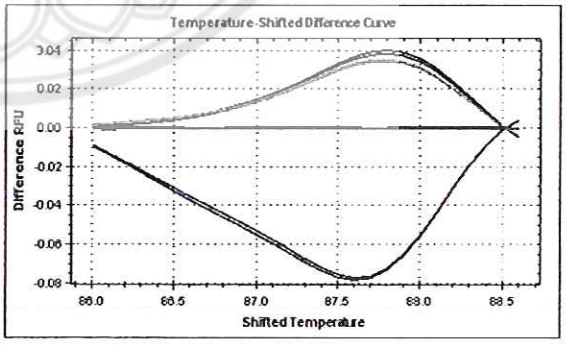
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

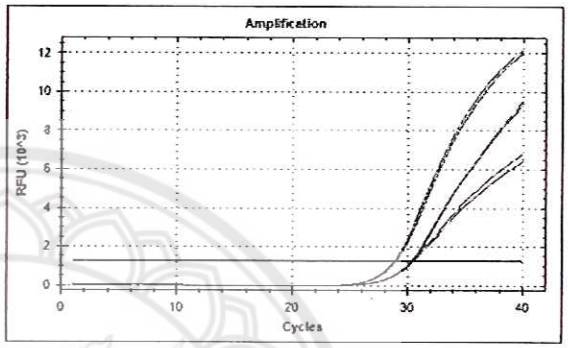


ตัวอย่าง H3

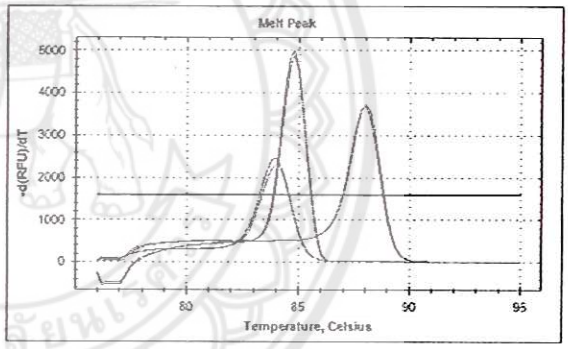
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

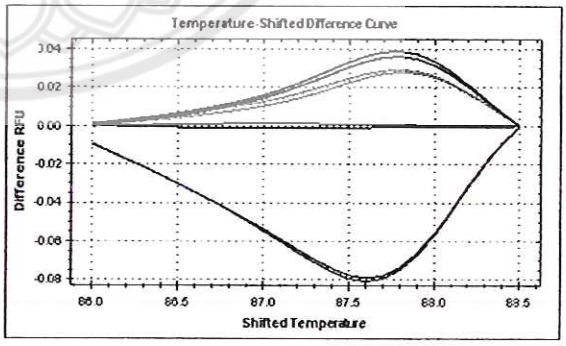
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

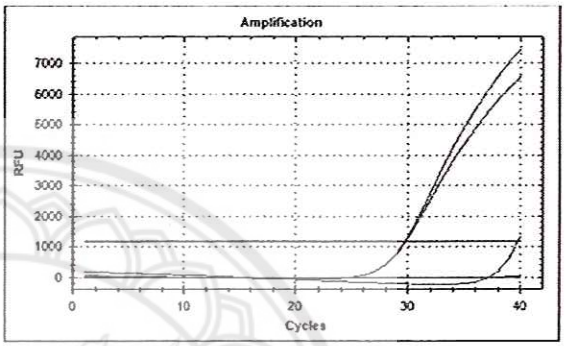


ตัวอย่าง H4

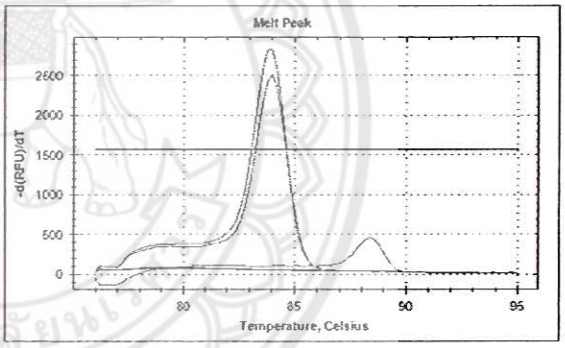
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



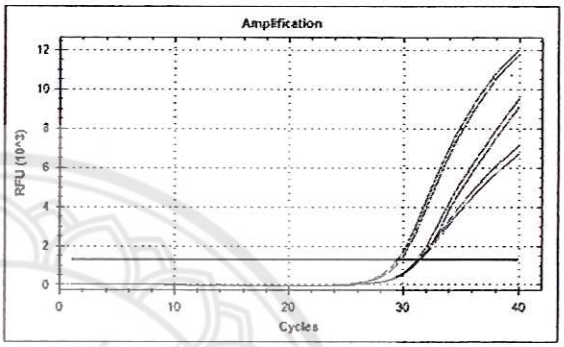
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซซาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H5

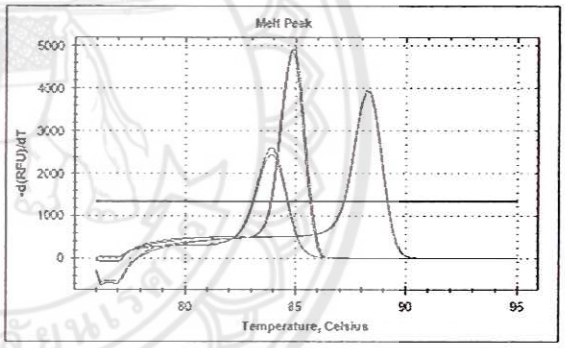
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

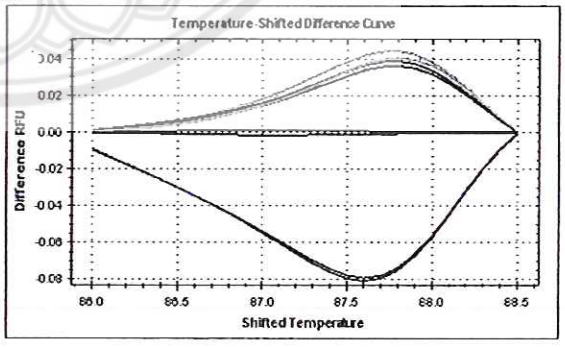
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

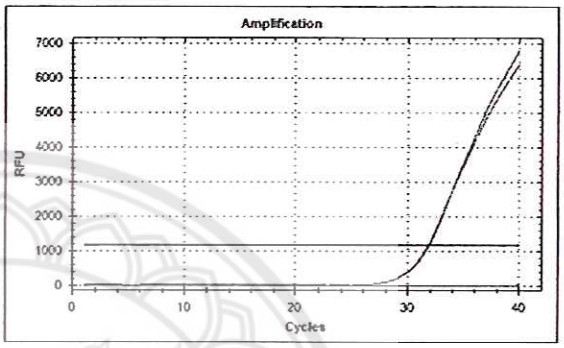


ตัวอย่าง H6

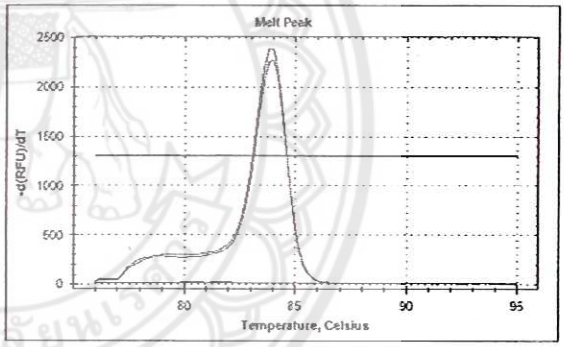
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม

สำหรับไพรเมอร์ A

1633781
วิ RC
641
.7.H35
ด1ษร3
2555

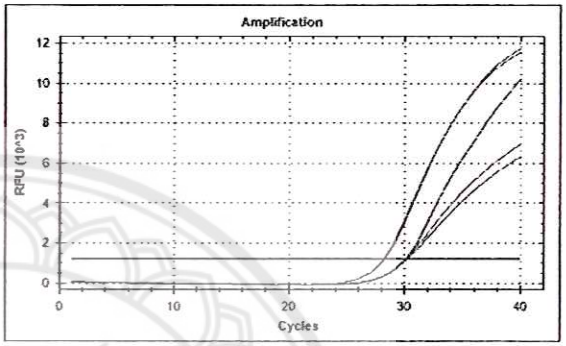
สำนักหอสมุด
19 ก.ค. 2556

ตัวอย่าง H7

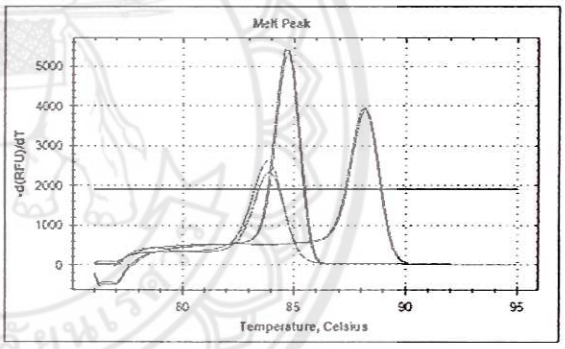
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

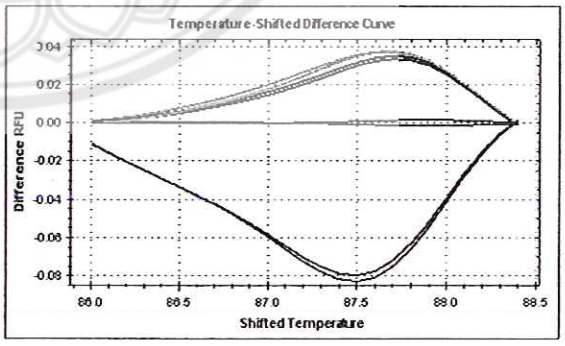
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

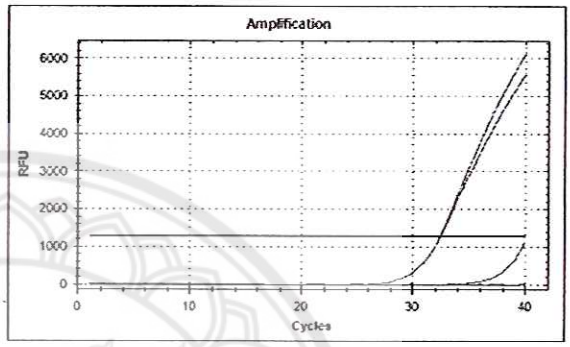


ตัวอย่าง H8

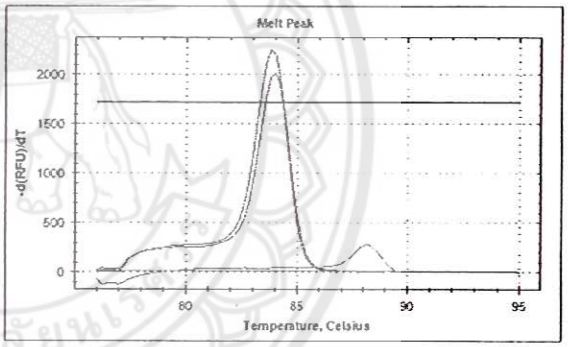
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



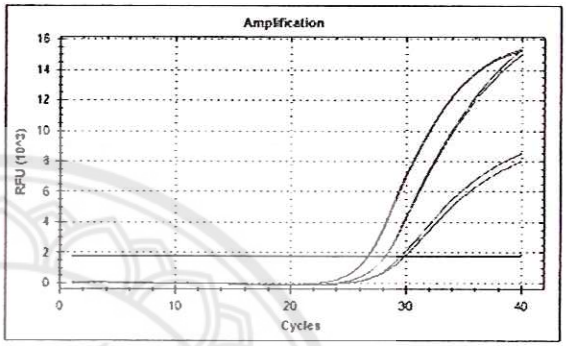
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H9

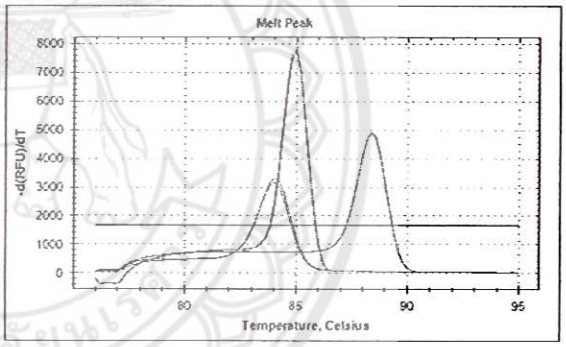
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A B และ C

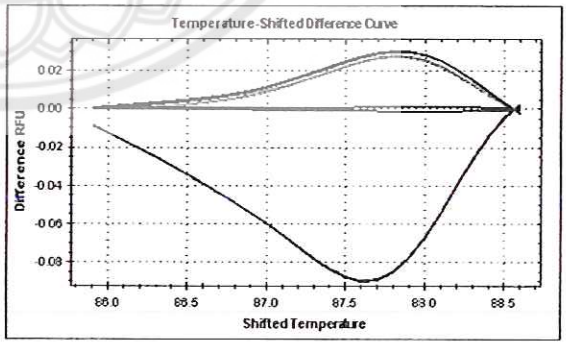
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ชอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

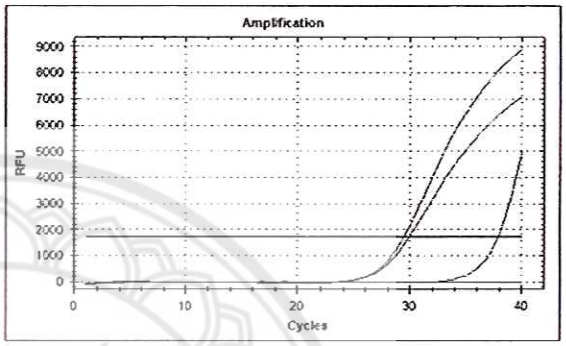


ตัวอย่าง H10

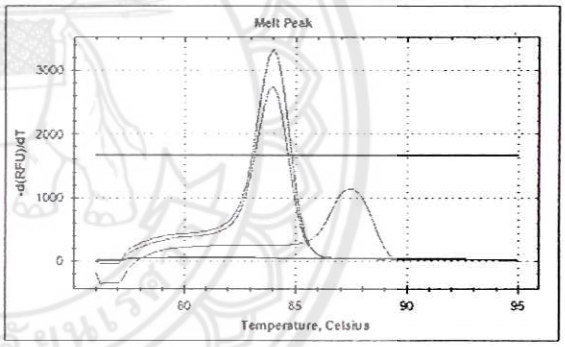
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม

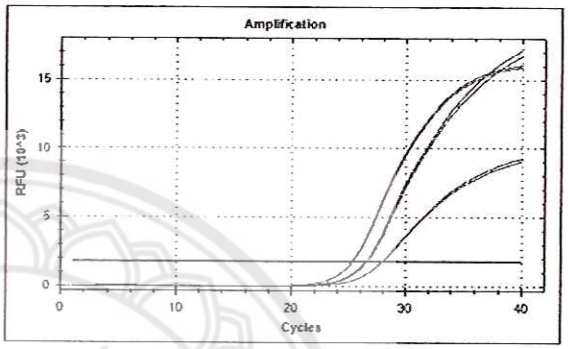
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H11

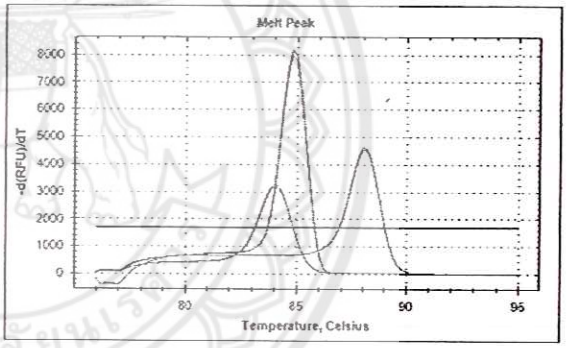
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

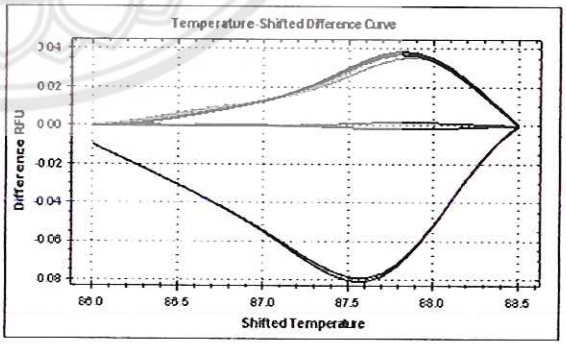
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ชอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

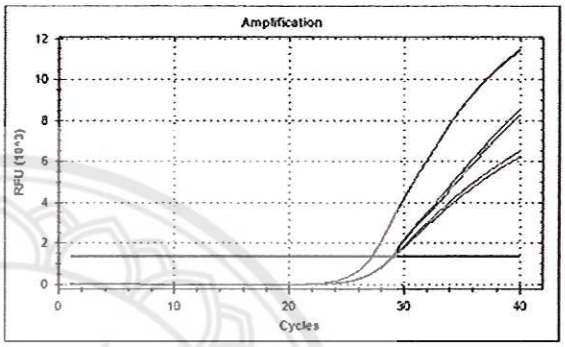


ตัวอย่าง H12

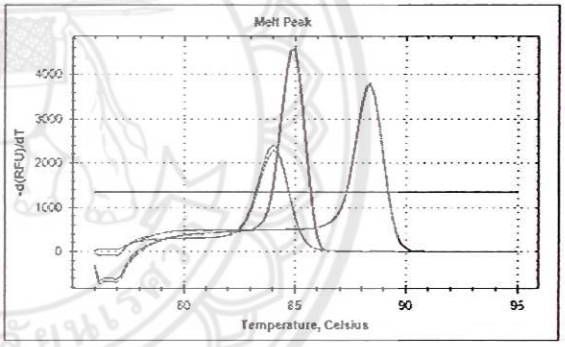
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

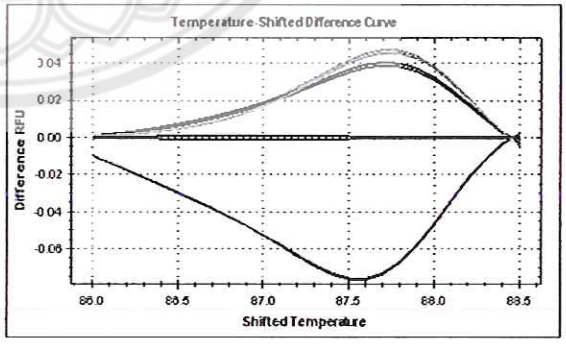
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

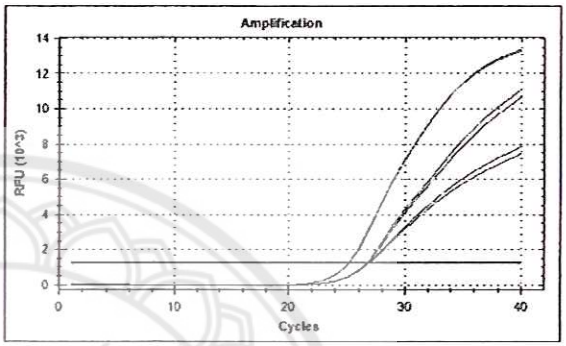


ตัวอย่าง H13

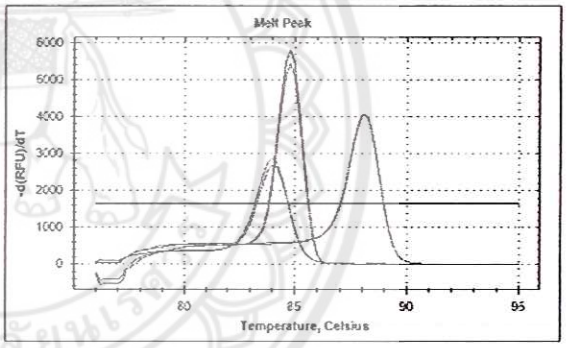
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

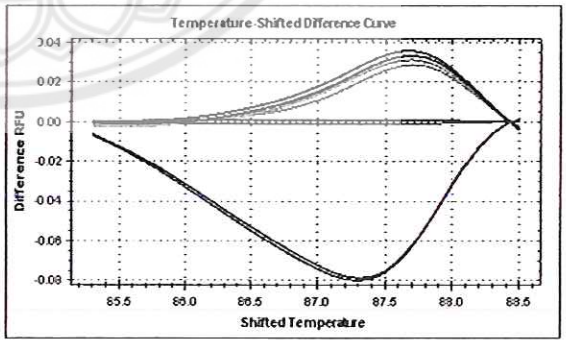
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

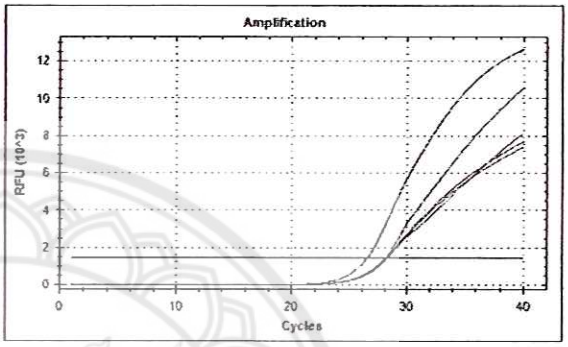


ตัวอย่าง H14

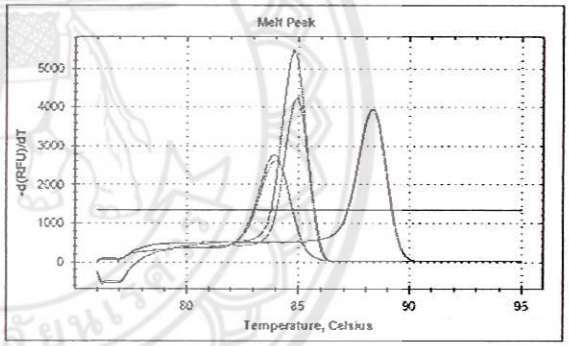
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

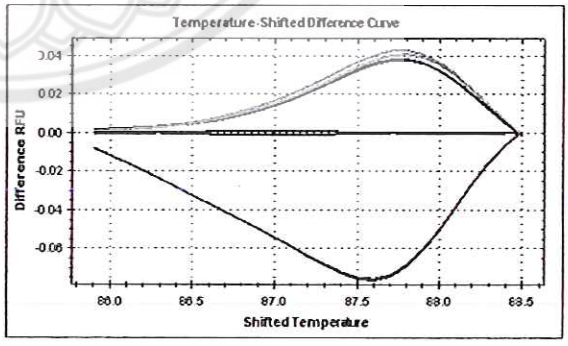
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ชอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

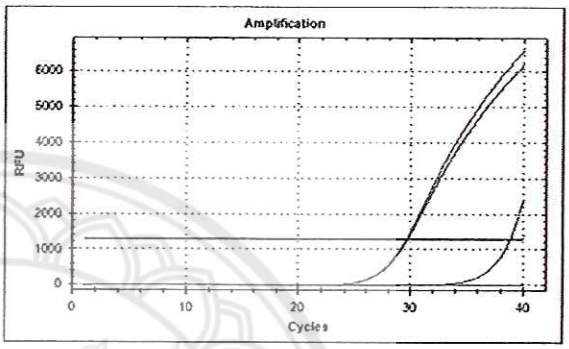


ตัวอย่าง H15

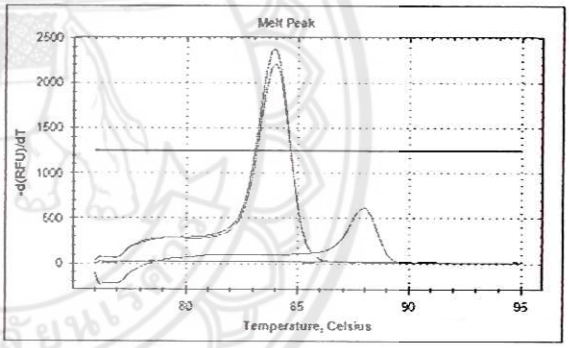
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



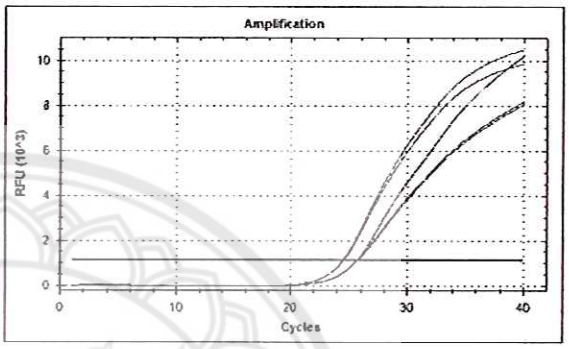
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H16

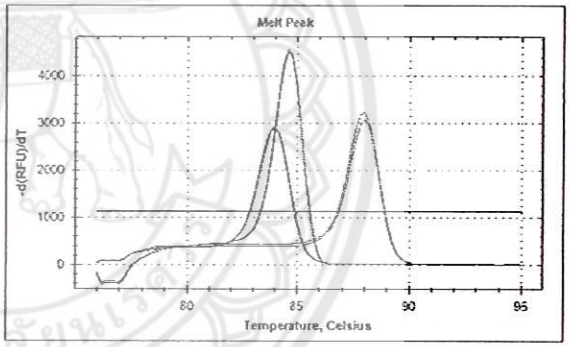
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

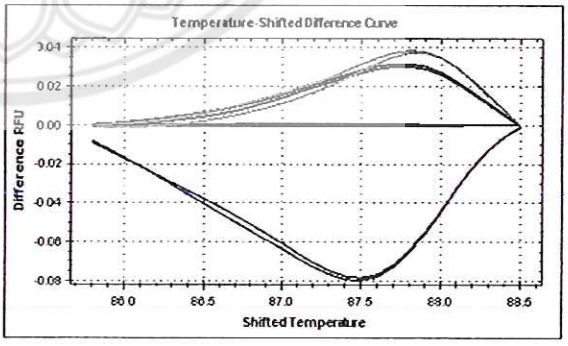
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

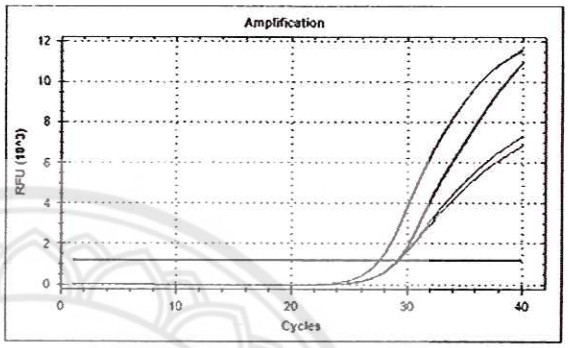


ตัวอย่าง H17

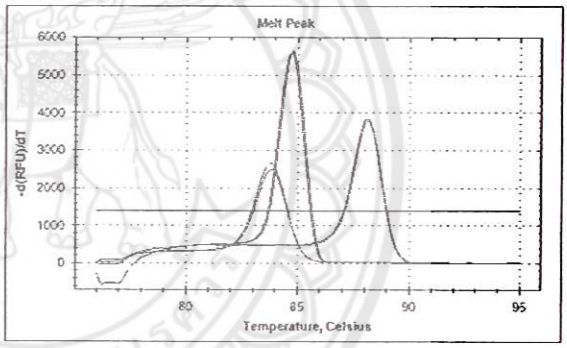
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

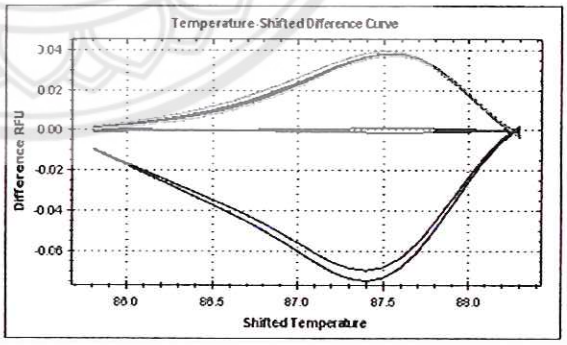
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

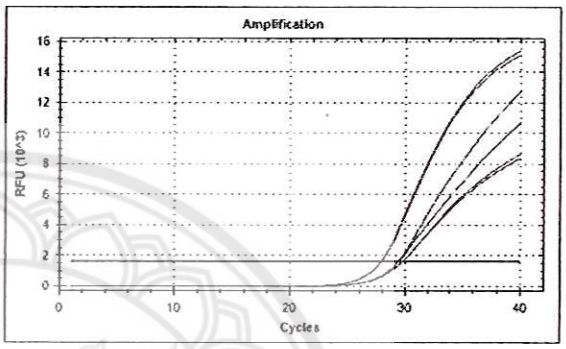


ตัวอย่าง H18

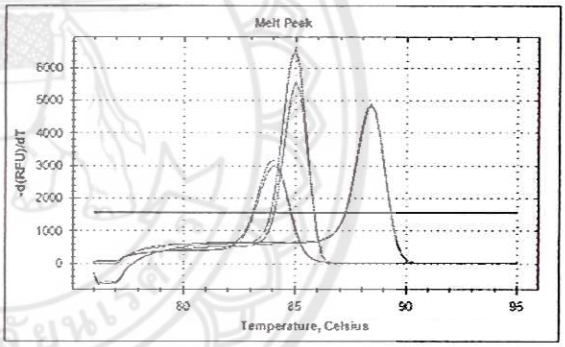
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

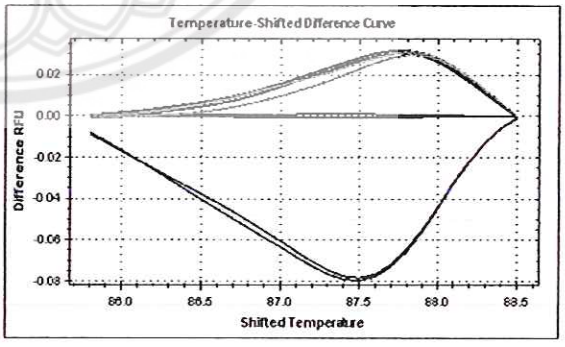
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

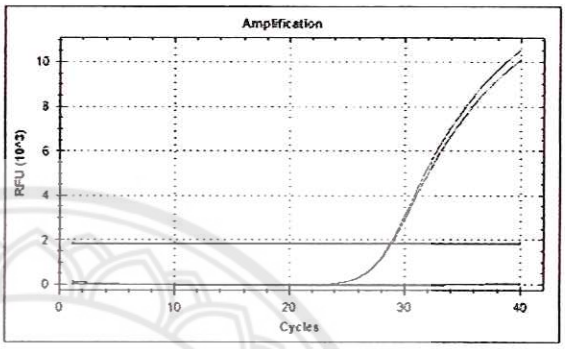


ตัวอย่าง H19

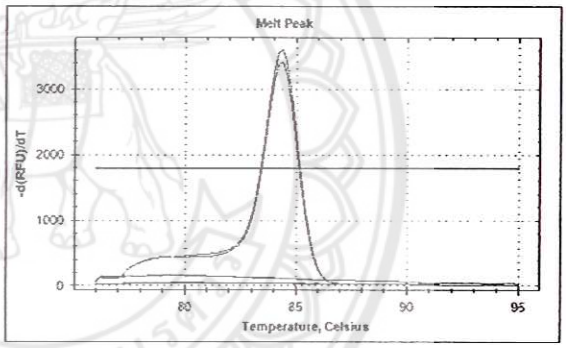
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



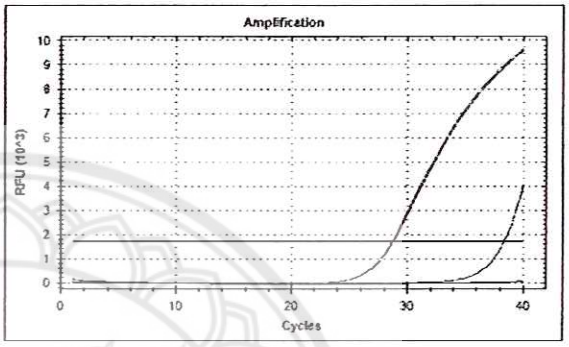
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A –

ตัวอย่าง H20

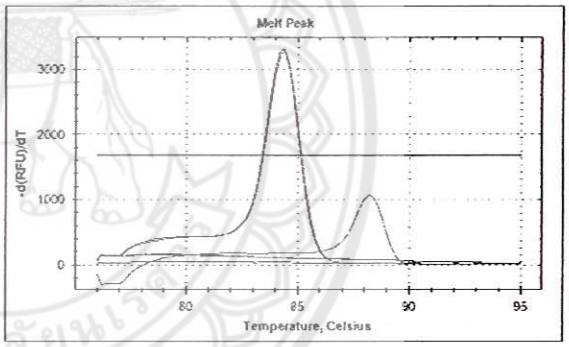
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



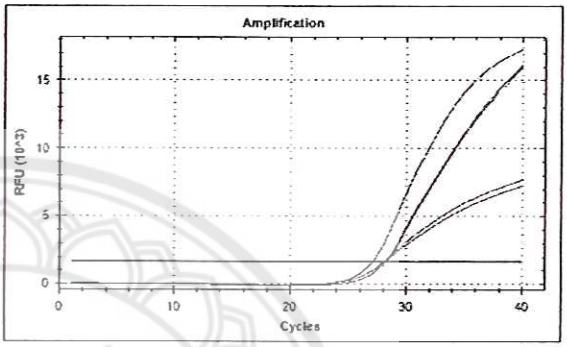
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H21

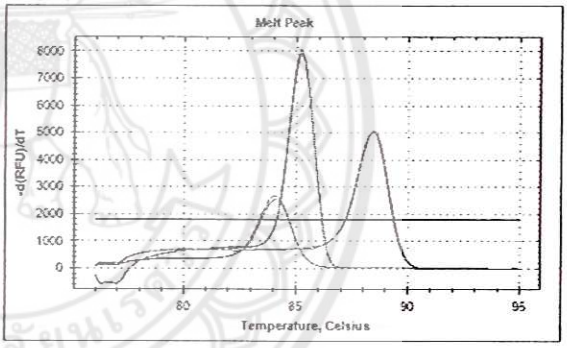
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

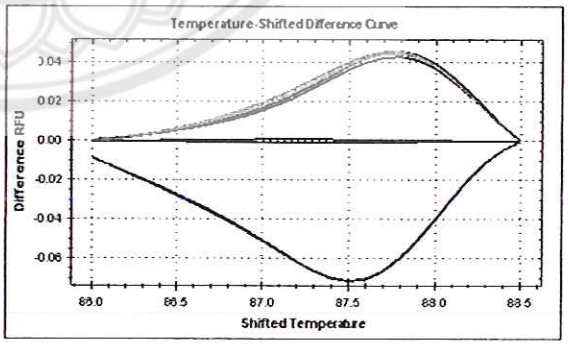
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

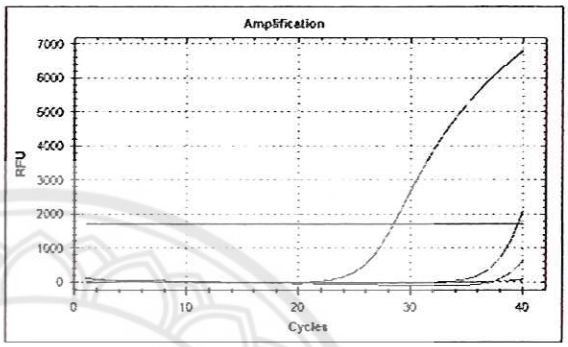


ตัวอย่าง H22

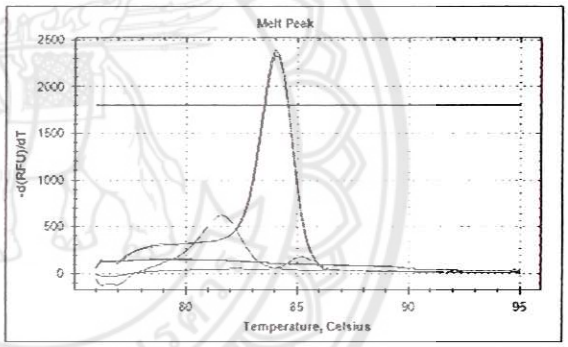
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



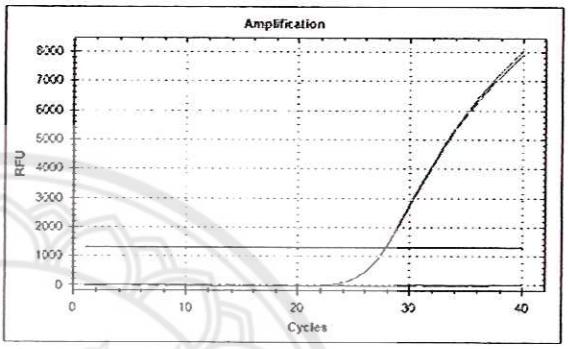
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ชอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A –

ตัวอย่าง H23

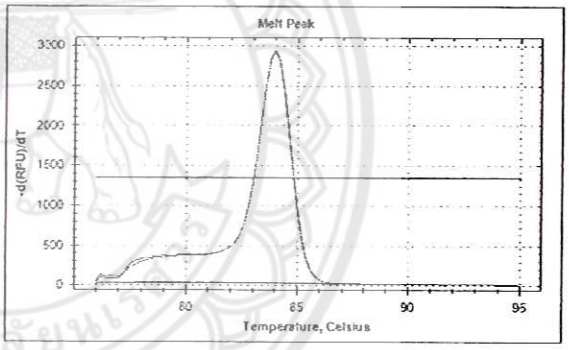
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม –

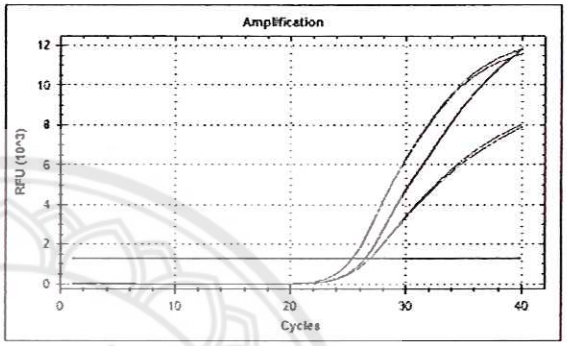
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H24

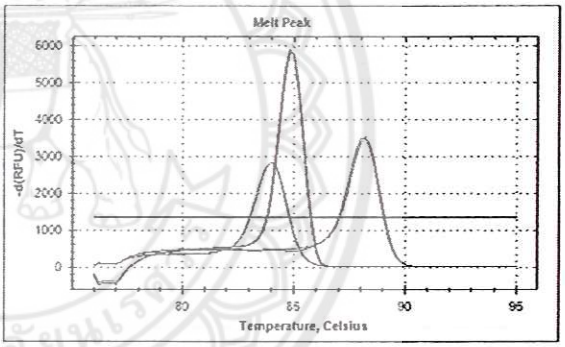
จีโนไทป์ $\alpha\alpha^{CS}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ A, B และ C

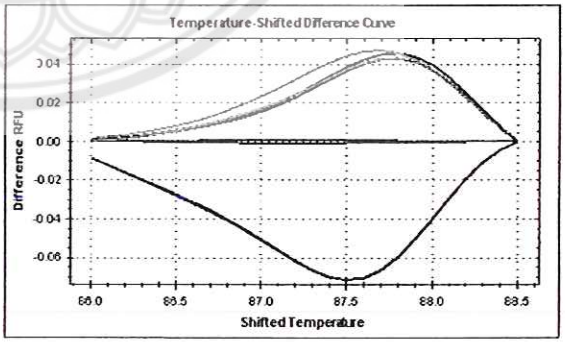
กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

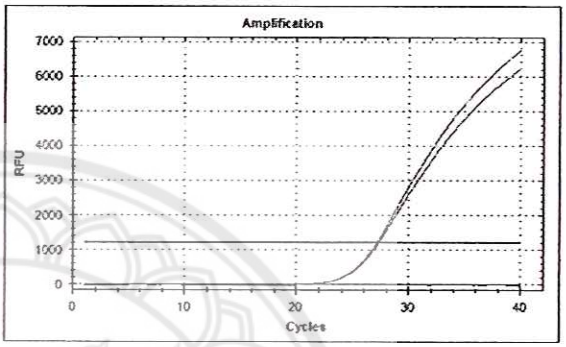


ตัวอย่าง H25

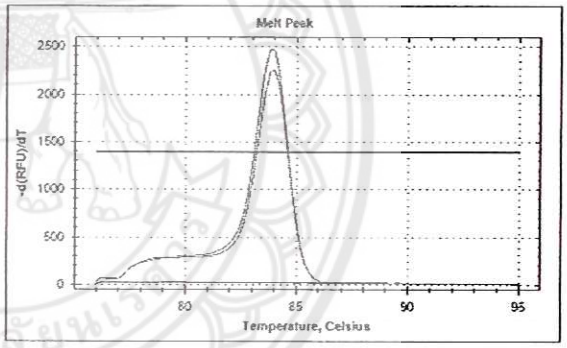
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



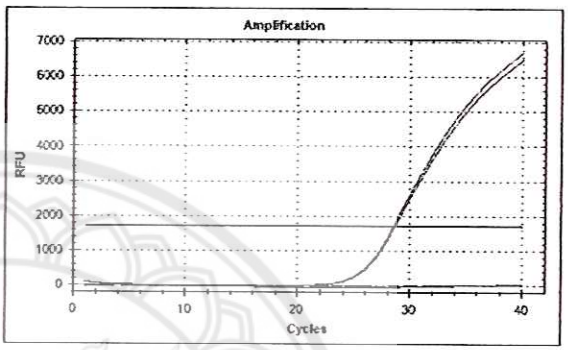
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H26

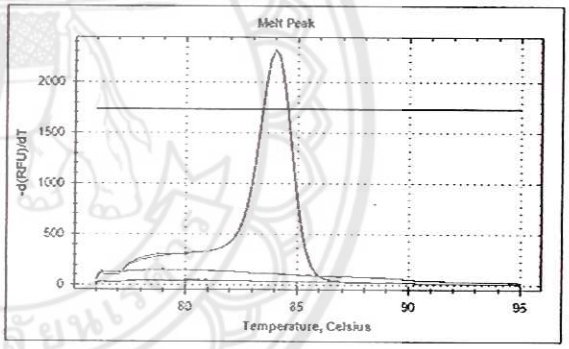
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



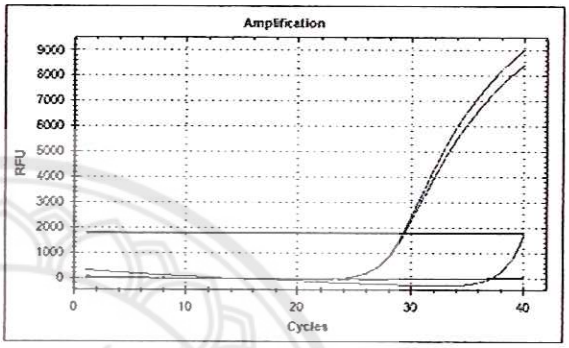
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H27

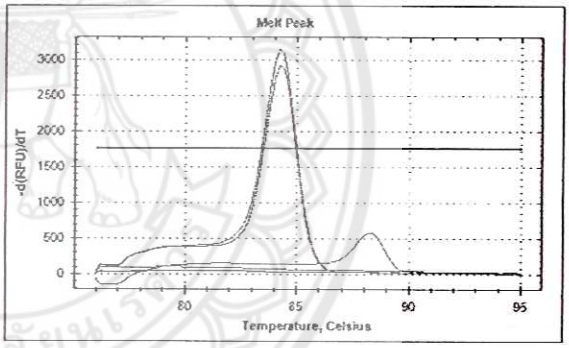
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



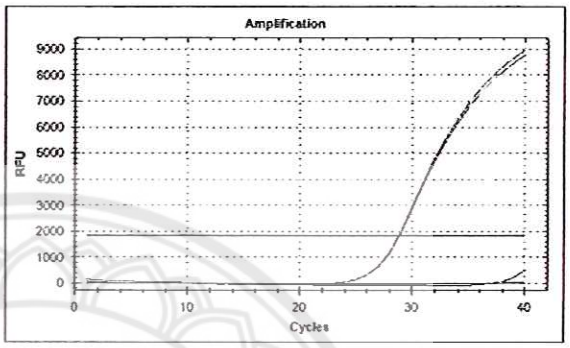
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H28

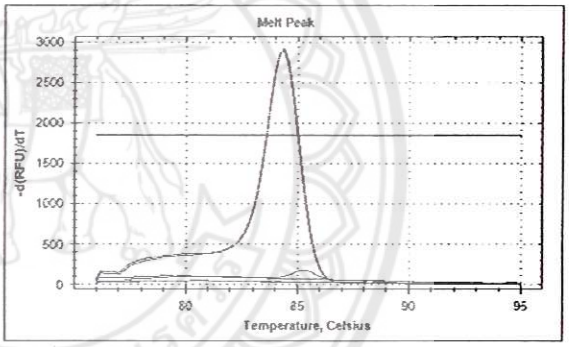
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



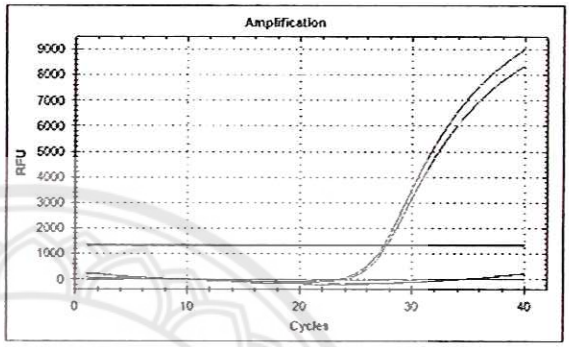
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H29

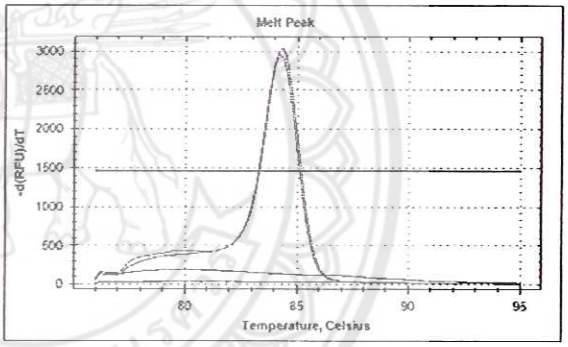
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



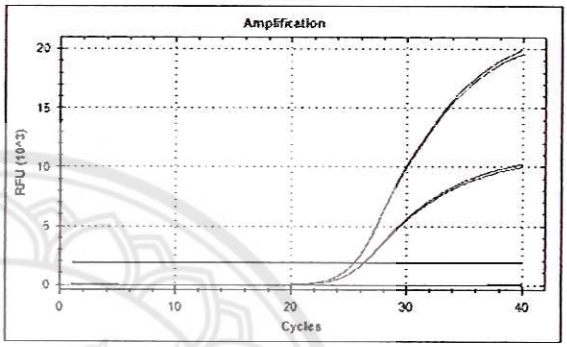
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A –

ตัวอย่าง H30

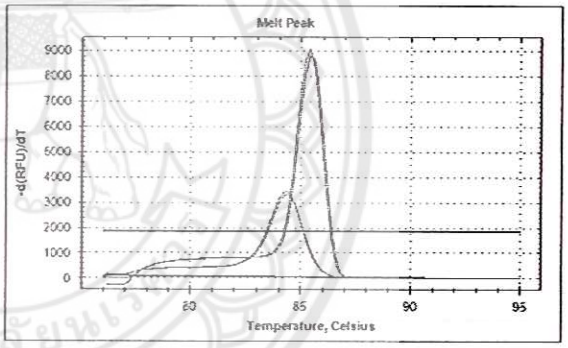
จีโนไทป์ $-\alpha^{4.2}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ B และ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม

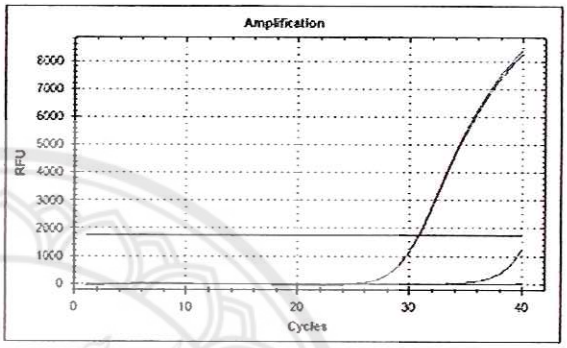
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H31

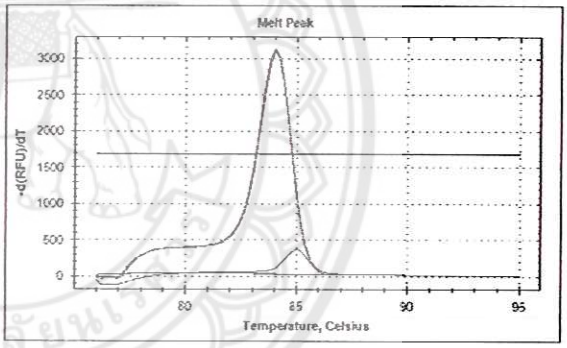
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จาก
ตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของ
ดีเอ็นเอ



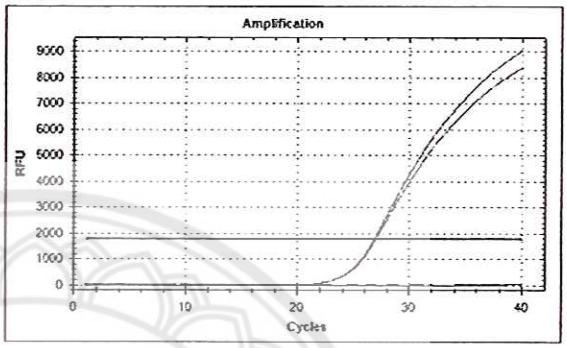
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H32

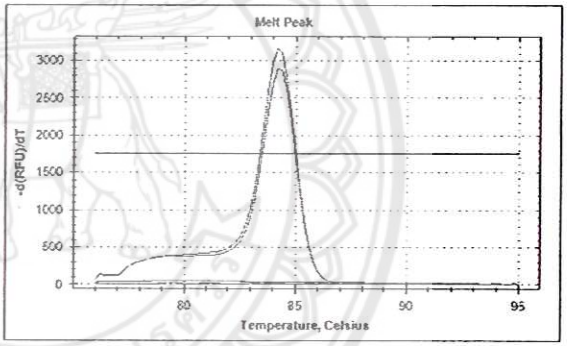
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



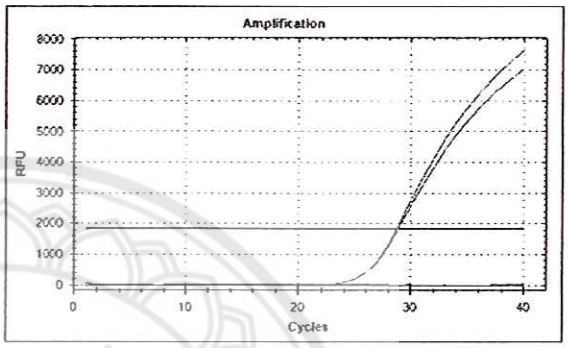
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A –

ตัวอย่าง H33

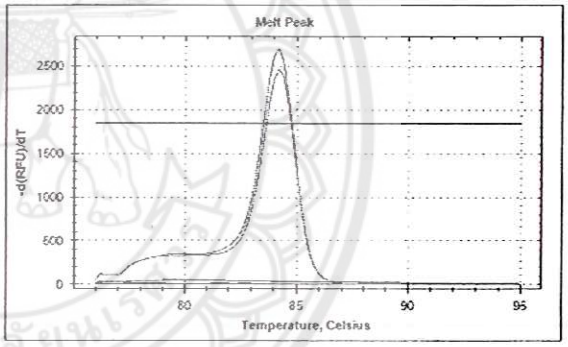
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็ม

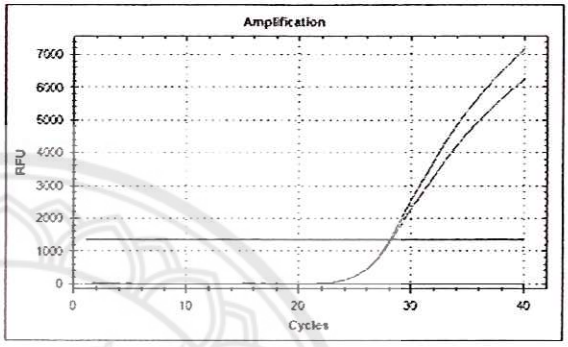
สำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H34

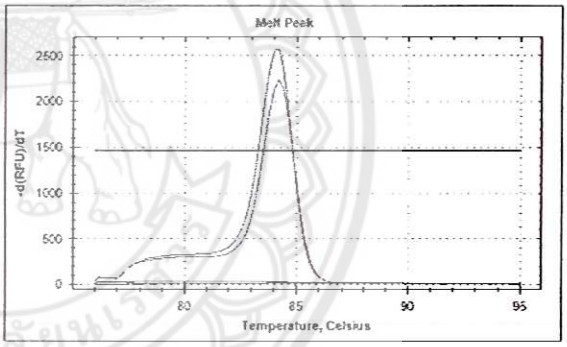
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



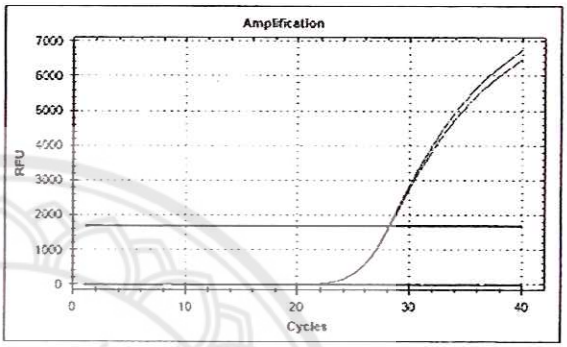
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

ตัวอย่าง H35

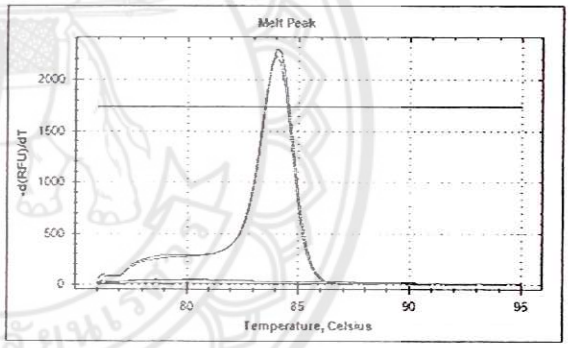
จีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/--^{SEA}$

ไพร์เมอร์ที่สามารถทำงานได้ C

กราฟสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากตัวอย่างวิเคราะห์



กราฟคุณลักษณะการแยกสายของดีเอ็นเอ



จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็ซอาร์เอ็มสำหรับไพรเมอร์ A

ภาคผนวก ข : ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ-นามสกุล** รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวัลย์ ฉิมภู่
2. **เลขหมายประจำตัวประชาชน** 3 4099 00527 65 9
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** รองศาสตราจารย์ ระดับ 9
4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก
โทรศัพท์ : 66-55-96 4633 โทรสาร : 66-55-964770
มือถือ : 081-7403411
E-mail : dawans@nu.ac.th

5. ประวัติการศึกษาโดยสังเขป

คุณวุฒิ	ตั้งแต่-ถึง	ชื่อสถานศึกษา	แหล่งทุนที่ได้รับ
Post-Doctoral Degree in Molecular biology	2538-39	Oxford University, England	EEC-Foundation
USAID Diploma in Biochem.	2530-31	Isarel Institute of Teachnology, Isarel.	USAID
Ph.D. (Biochem.)	2527-30	University College,Ireland	U-Foundation
UNESCO Diploma in Biochem.	2524-25	Tokyo Institute of Technology, Japan.	UNESCO
มหาวิทยาลัยมหิดล ไทย	2517-19	วท.ม (ชีวเคมี)	WHO
มหาวิทยาลัยมหิดล ไทย	2512-16	วท.บ (เทคนิคการแพทย์)	-

ประวัติการรับราชการ

ปี พ.ศ.ที่ทำงาน	ตำแหน่งที่ได้รับ	ชื่อสถานที่ทำงาน
2520-2522	อาจารย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
2522-2523	อาจารย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2523-2535	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2535-2536	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	มหาวิทยาลัยนเรศวร
2536-ปัจจุบัน	รองศาสตราจารย์	มหาวิทยาลัยนเรศวร

6. **สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ** การพัฒนาชนบทอย่างยั่งยืน การพัฒนาอาชีพชุมชน
7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

7.1 ประสบการณ์การเป็นผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัย

1. การศึกษาและพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์โรคเบต้าธาลัสซีเมีย (โครงการต่อเนื่อง 2 ปี) ปีงบประมาณ 2547-48 แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน
2. การพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์และบรรจุภัณฑ์น้ำตาลกะทิเพื่อการอุตสาหกรรมในครัวเรือนที่ยั่งยืน ปีงบประมาณ 2547 แหล่งทุน: สกอ.

3. การใช้ทรัพยากรท้องถิ่นอย่างยั่งยืน ปีงบประมาณ 2549 แหล่งทุน: สกอ.
4. แผนพัฒนาผลิตภัณฑ์พื้นบ้านเข้าสู่หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์: ปีงบประมาณ 2547 แหล่งทุน: สกอ.

7.2 ประสบการณ์การเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

1. โครงการถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย (โครงการต่อเนื่อง 2 ปี) ปีงบประมาณ 2547-48 แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน
2. พัฒนากระบวนการผลิตน้ำตาลกะทิให้มีคุณภาพ รสชาดและรูปลักษณ์เป็นที่ต้องการของตลาดอย่างแพร่หลาย ปีงบประมาณ 2547 แหล่งทุน: สกอ.
3. การพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์มะม่วงม้วนเพื่อการอุตสาหกรรมในครัวเรือนที่ยั่งยืน ปีงบประมาณ 2547 แหล่งทุน: สกอ.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การผลิตชีวมวลของ *Candida tropicalis* จากน้ำเสียเพื่อใช้เป็นแหล่งของเบตากลูแคน ปีงบประมาณ 2550 แหล่งทุน: สกว-สสว. สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย
2. การคัดแยกจุลินทรีย์ดินผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อการอุตสาหกรรม ปีงบประมาณ 2550 แหล่งทุน: งบประมาณมหาวิทยาลัยนเรศวร สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

7.4 ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ตีพิมพ์ย้อนหลัง 5 ปี)

1. A sensitive assay for non-specific N-methltransferase Acticity in rat tissue by HPLC with electrochemical detection. Asean Journal on Science &Technology for Development.2003: 19(1)63-68.
2. Spontaneous mutation of the hemoglobin Leiden (β 6 or 7 Glu→0) in a Thai girl. Haematologica.2003: 88(12) ECR35
3. Associations of common β-thalassemia mutations with β- globin gene frameworks in Northern Thailand. ASEAN Journal on Science and Technology for Development, 2004: 21(1)
4. Homogrneity of β- thalassemia Codon 17 (A-T) Alleles in Northern Thailand Using a Direct DNA Sequencing Method. J. Med Assoc Thai, 2004:87(8):883-6
5. The Spectrum of β-thalassemia mutations in Phitsanulok Province: Development of multiplex ARMS for mutation detection. Naresuan University Journal 2007;15(1):43-53

6. Rapid detection and prenatal diagnosis of β-thalassemia. **Naresuan University Journal**, Issn0858-7418, 2007: Vol.7 No.2 July-Dec
7. The Spectrum of β-thalassemia mutations in Phitsanulok Province: Development of multiplex ARMS for mutation detection. **Naresuan University Journal** 2007; 15(1):43-53 8. Detection of β-thalassemia mutations using multiplex ARMS assay.**Hemoglobin**32 (3) 2008
8. Rapid Detection of β-Thalassemia Mutations in Thailand using Multiplex ARMS **ASEAN Journal on Science and Technology for Development** 2007

7.5 ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (นำเสนอในการสัมมนาวิชาการระดับนานาชาติ)

1. Apontaneous mutation of haemoglobin Leiden on maternal inherited chromosome, FAOB Meeting 2004, Bankok, Thailand
2. Noninvasive prenatal exclusion of β- thalassemia/HbE by analysis of fetal HbE gene in maternal plasma, 2nd International Forensic Science Conference 2007,Thailand
3. Detection of β-thalassemia mutations using multiplex ARMS assay. FAOB-Meeting, 2008 Aten, Greeze

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นพ.ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 5099 00200 32 2
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาตราจารย์เกียรติคุณ
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ห้องปฏิบัติการธาลัสซีเมีย ภาควิชากุมารเวชศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ : 053-946480 โทรสาร : 053-357331
E-mail : tsanguan@.med.cmu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาเอก : วุฒิบัติแพทย์ผู้เชี่ยวชาญโรคเด็ก
สถาบัน/มหาวิทยาลัยมิวนิค ประเทศเยอรมันนี
ปีที่สำเร็จการศึกษา : 2516

6. ประสบการณ์การสอน หรือความเชี่ยวชาญทางวิชาการ

กุมารเวช ธาลัสซีเมีย และโรคฮีโมโกลบินผิดปกติ

7. ผลงานทางวิชาการ

1. Increased Hb A2 values in an HIV-1-infected patient receiving antiretroviral drugs: a pitfall for thalassemia antenatal diagnosis. Pornprasert S, Sukunthamala K, Leechanachai P, Sanguansermsri T. Hemoglobin. 2009;33(2):158-61.
2. Perinatal zidovudine prophylaxis in HIV type-1-infected pregnant women with thalassaemia carriage in Thailand. Briand N, Pornprasert S, Ngo-Giang-Huong N, Galactéros F, Pissard S, Tatu T, Sanguansermsri T, Jourdain G, Lallemant M, Le Coeur S. Antivir Ther. 2009;14(1):117-22.
3. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia/Hb E by hemoglobin typing compared to DNA analysis. Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguansermsri T. Hemoglobin. 2009;33(1):17-23.
4. Detection and identification of beta-thalassemia 3.5 kb deletion by SYBR Green1 and high resolution melting analysis. Prathomtanapong P, Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansermsri T. Eur J Haematol. 2009 Feb;82(2):159-60. Epub 2008 Nov 10. No abstract available.
5. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 16;105(50):19920-5. Epub 2008 Dec 5.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย (1)

1. **ชื่อ-นามสกุล** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี
2. **เลขหมายประจำตัวประชาชน** 3 1024 01243 77 5
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

   ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก
5. **ประวัติการศึกษา**

   พ.ศ. 2535 สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

   พ.ศ. 2535 รัฐประศาสนศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

พ.ศ. 2547 วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) มหาวิทยาลัยนเรศวร

พ.ศ. 2550 นิติศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีววิทยาโมเลกุล

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

1. ความสัมพันธ์ของโครงสร้างกับหน้าที่ของโปรตีน non-structural 1 ในไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่แยกได้ในประเทศไทย แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2550
2. การวินิจฉัยยีนที่ทำให้เกิดโรคเบต้าธาลัสซีเมียด้วย DHPLC แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2550
3. การวิเคราะห์รูปแบบการกลายพันธุ์ของเบต้าธาลัสซีเมียในเขตภาคเหนือตอนล่าง แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2550
4. โครงการย่อย: การศึกษายีนของฮีโมโกลบินอีในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินอีเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย ภายใต้ชุดโครงการวิจัย การศึกษาและพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์โรคเบต้าธาลัสซีเมีย ผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวัลย์ ฉิมภู่ (ตุลาคม 2546 - กันยายน 2548) ทุนงบประมาณแผ่นดินปีงบประมาณ 2547-2548

7.2 งานวิจัยที่เผยแพร่ : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

1. Rawangkhan A, Sanguansermsri D, Suwannakhon N, Pongcharoen S, Pensuwan P, Chamnanpood C, Chamnanpood P, Sanguansermsri P. (corresponding author)
   Comparison of neuraminidase activity of influenza A virus subtype H5N1 and H1N1 using reverse genetics virus. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010 May;41(3):562-9.
2. Suwannakhon N, Pookorn S, Sanguansermsri D, Chamnanpood C, Chamnanpood P, Wongvilairat R, Pongcharoen S, Niumsup PR, Kunthalert D, Sanguansermsri P. (corresponding author)
   Genetic characterization of nonstructural genes of H5N1 avian influenza viruses isolated in Thailand in 2004-2005. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2008 Sep;39(5):837-47.
3. Naksuphan N, Sanguansermsri D, Wongvilairat R, Niumsup PR, Pongcharoen S, Chamnanpood P, Chamnanpood C, and Sanguansermsri P.

(corresponding author)

Whole genome sequences of H5N1 influenza A virus isolated from a little grebe in Thailand.

Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2008 May; 39(3):373-382.

4. **Sanguansermsri** P, Shimbhu D, Wongvilairat R, Saetung R, Sanguansermsri T.

   Homogeneity of beta 0-Thalassemia Codon 17 (A-->T) Alleles in Northern Thailand using a Direct DNA Sequencing Method. J Med Assoc Thai. 2004 Aug; 87(8):883-886.

5. **Sanguansermsri** P, Shimbhu D,Wongvilairat R, Sanguansermsri T.

   Associations of Common beta-Thalassemia Mutations with beta-Globin Gene Frameworks in Northern Thailand. ASEAN Journal on Science and Technology for Development 2004 Mar; 21(1) 53-56.

6. **Sanguansermsri** P, Shimbhu D, Wongvilairat R, Pimsorn C, Sanguansermsri T.

   Spontaneous Mutation of the Hemoglobin Leiden (beta 6 or 7 Glu-->0) in a Thai Girl. Haematologica. 2003 Dec; 88(12): ECR35.

7. **Sanguansermsri** P, Shimbhu D, Wongvilairat R, and Sanguansermsri T.

   Spontaneous Mutation of the Hemoglobin Leiden on Maternal Inherited Chromosome. The 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / A-IMBN Meeting: Genomic and Health in the 21th Century, 22-26 November 2004 Bangkok, Thailand.

8. จุฑามาศ เทพมาลี สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ ดามรัศมน สุรางกูร ดลฤดี สงวนเสริมศรี **พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี**, บทบาทของโปรตีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนกที่ได้จาก reverse genetic virus ต่อการแสดงออกของยีน type I (α/β) interferon ในเซลล์เพาะเลี้ยง primary chicken embryonic fibroblast, รายงานการประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 15 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา 14-15 ธันวาคม 2552

9. นิคม นาคสุพรรณ พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์ ดลฤดี สงวนเสริมศรี จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย

   ชำนาญพูด และ **พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี**, การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน NS1 ของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ด้วยวิธี denaturing high performance liquid

chromatography (DHPLC), รายงานการประชุมวิชาการนเรศวรวิจัยครั้งที่ 3 วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2550 อาคารเรียนรวมเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษาฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

10. วราภรณ์ แก้วคอน ดลฤดี สงวนเสริมศรี จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย ชำนาญพูด สุธาทิพย์
พงษ์เจริญ พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์ และ **พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี**, การผลิตโปรตีน Hemagglutinin จากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 เพื่อหาชนิดย่อย (subtype) ของแอนติบอดีของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธี ELISA, รายงานการประชุมวิชาการนเรศวรวิจัยครั้งที่ 3 วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2550 อาคารเรียนรวมเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษาฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
11. สมลักษณ์ กันธิยะวงษ์ ดลฤดี สงวนเสริมศรี นิคม นาคสุพรรณ พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์ ดวงกมล
ขันธเลิศ จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด ปุริณทรา เพ็ญสุวรรณ พรชัย ชำนาญพูด และ **พันธุ์ชนะ**
สงวนเสริมศรี, ลักษณะตำแหน่ง receptor binding, glycosylation และ HA cleavage ของ Hemagglutinin ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่มีการระบาดในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2546 – 2548, รายงานการประชุมวิชาการนเรศวรวิจัยครั้งที่ 3 วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2550 อาคารเรียนรวมเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษาฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
12. กรุง ผิวพรรณ์ ดลฤดี สงวนเสริมศรี จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย ชำนาญพูด พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์ และ **พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี**, การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 โดยวิธี Denaturing High Performance Liquid Chromatography, การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 6 (กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) 13-14 ตุลาคม 2549 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
13. ปุริณทรา เพ็ญสุวรรณ ดลฤดี สงวนเสริมศรี จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย ชำนาญพูด พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์ ดวงกมล ขันธเลิศ และ **พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี**, การโคลนและการแสดงออกของยีน NS1 ของเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ใน *Escherichia coli*, การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 6 (กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) 13-14 ตุลาคม 2549 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
14. นิคม นาคสุพรรณ ดลฤดี สงวนเสริมศรี รสริน ว่องวิไลรัตน์ พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์ จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย ชำนาญพูด และ **พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี**, การวิเคราะห์

ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากนกเป็ดผีเล็กในประเทศไทย, รายงานการประชุมวิชาการนเรศวรวิจัยครั้งที่ 2 วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2549 โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

15. สรัสวดี ภู่กร ดลฤดี สงวนเสริมศรี รสริน ว่องวิไลรัตน์ จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย ชำนาญพูด และ **พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี**, ความเหมือนของโปรตีน Nonstructural 1 (NS1) ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากในประเทศไทย, รายงานการประชุมวิชาการนเรศวรวิจัยครั้งที่ 2 วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2549 โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
16. สายศิริ มีระเสน พีระพล วอง พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี ปริศนา เจริญพร แน่งน้อย เจิมนิ่ม สุขุมาล นิยมธรรม กุลนิษฐ์ แพงวังทอง และ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, การวิเคราะห์รูปแบบการกลายพันธุ์ของเบต้าธาลัสซีเมียในเขตจังหวัดพิษณุโลก, รายงานการประชุมวิชาการนเรศวรวิจัยครั้งที่ 2 วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2549 โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
17. นิคม นาคสุพรรณ ดลฤดี สงวนเสริมศรี พรรณนิกา เนียมทรัพย์ จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย ชำนาญพูด และ พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี, Matrix gene ของไวรัส Influenza ที่แยกได้จาก *Tachybaptus rufficolis* ในประเทศไทย: การต้านต่อยา amantadine ตามธรรมชาติ? การประชุมวิชาการ "นเรศวรวิจัย" ครั้งที่ 1, 28-29 กรกฎาคม 2548 มหาวิทยาลัยนเรศวร
18. สรัสวดี ภู่กร จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย ชำนาญพูด ดลฤดี สงวนเสริมศรี สุธาทิพย์ พงศ์เจริญ รสริน ว่องวิไลรัตน์ และ พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี, การปรากฏใหม่ของกรดอะมิโน 5 ชนิดของ nonstructural protein 1 (NS1) ของเชื้อ Avian influenza: กรณีศึกษาในประเทศไทย, การประชุมวิชาการ "นเรศวรวิจัย" ครั้งที่ 1, 28-29 กรกฎาคม 2548 มหาวิทยาลัยนเรศวร
19. ปุริณทรา เพ็ญสุวรรณ จันทร์เพ็ญ ชำนาญพูด พรชัย ชำนาญพูด พรรณนิกา เนียมทรัพย์ ดวงกมล ขันธเลิศ และ พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี, การแสดงออกของยีน NS1 ของเชื้อไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 ใน *E. coli*, การประชุมวิชาการ "นเรศวรวิจัย" ครั้งที่ 1, 28-29 กรกฎาคม 2548 มหาวิทยาลัยนเรศวร
20. สายศิริ มีระเสน ดาวัลย์ ฉิมภู่ มณฑล สงวนเสริมศรี พันธุ์ชนะ สงวนเสริมศรี พีระพล วอง และ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, รูปแบบการกลายพันธุ์ของเบต้าธาลัสซีเมียโดยวิธี multiplex ARMS และ DNA sequencing, การประชุมวิชาการ "นเรศวรวิจัย" ครั้งที่ 1, 28-29 กรกฎาคม 2548 มหาวิทยาลัยนเรศวร