Thesis Title Optimization of Multiplex Amplification Refractory Mutation System Technique in Prenatal Diagnosis of β-thalassemia major and β-thalassemia/Hb E disease

Author Miss Khanungnit Thungkham

Degree Master of science (Medical Technology)

Thesis Advisory committee

Assistant Professor Dr. Thanusak Tatu	Chairperson
Emeritus Professor Dr. Torpong Sanguansermsri	Member
Assistant Professor Dr. supatra sirichotiyagul	Member

ABSTRACT

β-thalassemia is a common genetic disease in Thailand. Prevention and control of this disease include public education, genetic counseling, heterozygote detection and prenatal diagnosis. The detection of heterozygote and prenatal diagnosis can be undertaken by characterization of β-thalassemia mutations. Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR is the PCR-based method that has been used to detect point mutations and small deletion of β-globin genes. The standard single ARMS-PCR normally detect one mutation in a single PCR reaction whereas the multiplex ARMS-PCR is able to identify more than one mutation in a single reaction. Thus, this study aimed to optimize the single and multiplex ARMS-PCR for detection of five common β-thalassemia mutations in northern Thailand which comprise of codons 41/42 (-TTCT), codon 17 (A-T), IVS I-nt 1 (G-T), codons 71/72 (+A) and codon 26 (G-A) or Hb E. Optimization of annealing temperature, common and specific primers in the single

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ARMS-PCR revealed that the optimal annealing temperature was 65^0C and optimal quantities of primers ranged from 0.1-0.2 μM. In multiplex ARMS-PCR with four combinations of primers including 1) codon 17 (A-T) + codons 41/42 (-TTCT), 2) codon 17 (A-T) + Hb E, 3) codons 41/42 (-TTCT) + Hb E and 4) codons 41/42 (-TTCT) + codons 71/72 (+A) + codon 17 (A-T), 300 μM dNTPs, 2.1 mM $MgCl_2$ and 0.4 μM common primer were optimal. 5 μl and 7 μl genomic DNA were utilised in the single and multiplex ARMS-PCR, respectively. The lowest WBC numbers to be used was 21,000 cells for the single ARMS-PCR and 10,500 cells for the multiplex ARMS-PCR. The applications of both types of ARMS-PCR in screening for β-thalassemia heterozygote as well as HbE and in the PND were successful. It was concluded that the ARMS-PCR is accurate, simple and cheap This technique can be implemented in the routine detection of β-thalassemia mutations in both clinical setting and heterozygote screening.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การปรับสภาวะที่เหมาะสมของ มัลติเพลก แอมพลิฟิเคชั่น รีแฟรกทอรี่ มิวเตชั่นซีสเต็มเทคนิค ในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโรคธาลัสซีเมีย เมเจอร์ และโรคเบต้าธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอี
ผู้เขียน	นางสาวคนึงนิจ ถุงคำ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนูศักดิ์	ตาตุ	ประธานกรรมการ
ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นพ.ต่อพงศ์	สงวนเสริมศรี	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ. สุพัตรา	ศิริโชติยะกุล	กรรมการ

บทคัดย่อ

เบต้าธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทย การป้องกันและควบคุมโรคนี้ประกอบด้วยกลยุทธ์สำคัญ 4 ประการคือ การให้ความรู้แก่ประชาชน การให้คำปรึกษาและแนะนำทางพันธุศาสตร์ การตรวจหาพาหะของโรคและการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด ในการตรวจหาพาหะของโรค และการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดนั้นสามารถอาศัยการแปลผลจากการพิสูจน์การตรวจชนิดการกลายพันธุ์ของ β-globin gene ซึ่งวิธี Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR) เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบการ กลายพันธุ์ของ β-thalassemia ได้ วิธี standard single ARMS-PCR จะสามารถตรวจพิสูจน์การกลายพันธุ์ได้เพียง 1 ชนิด ในขณะที่ multiplex ARMS-PCR สามารถตรวจพิสูจน์ชนิดของการกลายพันธุ์ได้หลายชนิดใน 1 การทดสอบ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อจะปรับสภาวะที่เหมาะสมของการทำ single และ multiplex ARMS-PCR สำหรับใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ β-globin gene 5 ชนิด ที่พบได้บ่อยในภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งได้แก่ ชนิด codons 41/42 (-TTCT), codon 17 (A-T), IVS I-nt 1 (G-T), codons 71/72 (+A) และ Hb E

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การปรับสภาวะที่เหมาะสมของ single ARMS-PCR ประกอบด้วยการทดสอบ annealing temperature และปริมาณของ specific primer ที่เหมาะสมในการทำ single ARMS-PCR โดยผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมและถูกเลือกใช้สำหรับ ARMS-PCR และปริมาณ specific primer ที่เหมาะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 0.1 ถึง 0.2 μM สำหรับการปรับสภาวะที่เหมาะสมของ multiplex ARMS-PCR นั้น ได้ทำการประยุกต์เทคนิค multiplex ARMS-PCR ขึ้นมา 4 สภาวะคือ 1) codon 17 (A-T) + codons 41/42 (-TTCT), 2) codon 17 (A-T) + Hb E, 3) codons 41/42 (-TTCT) + Hb E และ 4) codons 41/42 (-TTCT) + codons 71/72 (+A) + codon 17 (A-T) โดยใช้ปริมาณ dNTPs 300 μM, $MgCl_2$ 2.1 mM และ common primer 0.4 μM ซึ่งเป็นปริมาณที่ได้ทำการทดสอบแล้วว่า เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับ multiplex ARMS-PCR และการศึกษาปริมาณของเม็ดเลือดขาวสำหรับ ARMS-PCR พบว่าปริมาณของเม็ดเลือดขาวที่ต่ำที่สุดที่สามารถนำมาทำการทดสอบการกลายพันธุ์ โดยวิธี single ARMS-PCR ได้คือ 21,000 เซลล์ และสำหรับ multiplex ARMS-PCR คือ 10,500 เซลล์ โดยในปฏิกิริยา single ARMS-PCR ใช้ปริมาณ DNA template 5 μl และ 7 μl สำหรับ multiplex ARMS-PCR สามารถประยุกต์ใช้ single ARMS-PCR และ multiplex ARMS-PCR ในการตรวจคัดกรอง β-thalassemia heterozygote, Hb E และ การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโรคดังกล่าวได้ผลดี สรุปว่าวิธี ARMS-PCR เป็นวิธี DNA analysis ที่ถูกต้องแม่นยำและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหา β-thalassemia mutations ได้ทั้งในคลินิคและการศึกษาในประชากรทั่วไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved