



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การพัฒนาวิธี polymerase chain reaction with confronting two-pair primers
เพื่อตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาเบวธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส

Development of polymerase chain reaction with confronting two-pair
primers for diagnosis of α^+ thalassemia carrier 3.7 kb deletion type

โดย

ผศ.ดร.สมพล แพรพันธ์

ผศ.อดุลย์ บุญเฉลิมชัย

และ ผศ.ดร.สุพัตรา วัฒนสาธิตอาภา

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากร และเจ้าหน้าที่คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุน อีกทั้งขอขอบคุณบุคลากร และนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ ที่ให้ความร่วมมือในการเป็นอาสาสมัครตัวอย่างดีเอ็นเอ เป็นส่วนสำคัญให้การศึกษาวิจัยเรื่อง การพัฒนาวิธี polymerase chain reaction with confronting two-pair primers เพื่อตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟา บวกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ได้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัยในครั้งนี้ ส่งผลให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตรงตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ด้วยดี

สมพล แพรพันธ์

นักวิจัยหลัก



ชื่อเรื่อง: การพัฒนาวิธี polymerase chain reaction with confronting two-pair primers

เพื่อตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาบกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส

ผู้วิจัย: สมพล แพรพันธ์, อุดุลย์ บุญเฉลิมชัย

สถาบัน: คณะเทคนิคการแพทย์

และสุพัตรา วัฒนสาธิตอาภา

ปีที่พิมพ์: 2567

สถานที่พิมพ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: มหาวิทยาลัยรังสิต **จำนวนหน้างานวิจัย:** 52 หน้า

คำสำคัญ: แอลฟาบกธาลัสซีเมีย, ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส, ไพร์เมอร์ 2 คู่

ลิขสิทธิ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมชนิดฮีโมโกลินเอช ได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมจากบิดาและมารดาที่ฝ่ายหนึ่งเป็นพาหะชนิดแอลฟาบุญธาลัสซีเมียและอีกฝ่ายเป็นพาหะชนิดแอลฟาบกธาลัสซีเมีย โดยแนวทางป้องกันการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ที่มีประสิทธิภาพคือการตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียในคู่สมรส ร่วมกับการวางแผนก่อนมีบุตร งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบและพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยระดับยีน polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) เพื่อใช้ตรวจพาหะแอลฟาบกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสในประชากร การทดลองเริ่มจากนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากบุคลากรและนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ทราบว่าเป็นพาหะแอลฟาบกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสจำนวน 3 ราย มาหาลำดับเบสแล้ววิเคราะห์ตำแหน่งที่ขาดหายไปของยีนแอลฟา 2 โกลบิน เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ 1 เส้นให้จับได้อย่างจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของพาหะแอลฟาบกธาลัสซีเมีย และอีก 1 เส้นให้จับได้อย่างจำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ของคนปกติ เมื่อเพิ่มขยายยีนร่วมกับคู่ของไพร์เมอร์จะเกิด PCR product ขนาด 670 เบสในผู้ที่มียีนแอลฟาบกธาลัสซีเมีย และขนาด 491 เบสในผู้ที่มียีนแอลฟา 2 โกลบินปกติ การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี PCR-CTPP ในเบื้องต้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอพาหะแอลฟาบกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส จำนวน 7 ราย และคนปกติจำนวน 2 รายพบว่ามีค่าความจำเพาะและค่าความไวในการวินิจฉัยร้อยละ 100 ดังนั้นวิธี PCR-CTPP ที่ออกแบบและพัฒนาขึ้นนี้ น่าจะเป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับการตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาบกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสในประชากรได้

Title: Development of polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for diagnosis of α^+ thalassemia carrier 3.7 kb deletion type

Researcher: Somphon Phraephan, **Affiliation:** Faculty of Medical Technology
Adun Bunchalermchai, and Suphatra Watanasatitarpa

Year of Publication: 2024 **Publisher:** Rangsit University

Source: Rangsit University **No. of pages:** 52 pages

Keywords: α^+ thalassemia, polymerase chain reaction, confronting two-pair primers

Copyrights: Rangsit University

Abstract

Hemoglobin H disease is intermediate α thalassemia resulting from the interaction of parents who are α^0 thalassemia and α^+ thalassemia carriers. The most effective prevention of new case of HbH disease is prenatal diagnosis together with genetic counselling. The objective of this research was to design and develop the polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) for diagnosis of α^+ thalassemia carriers 3.7 kb type. DNA of personnel and student of Faculty of Medical Technology, Rangsit University were tested. DNA sequencing of 3 gap PCR products of α^+ thalassemia carriers 3.7 kb type were analyzed by dideoxy termination method. Two pair primers were designed based on the definite location of deletion on $\alpha 2$ globin gene. One primer was designed for specific binding to gene of α^+ thalassemia carriers 3.7 kb type. The other primer was designed for specific binding to normal $\alpha 2$ globin gene. After amplification, PCR product of those who carry gene of α^+ thalassemia was 670 bp. While, PCR product of those who carry normal $\alpha 2$ globin gene was 491 bp. Preliminary evaluation of 9 DNA samples found 100% of diagnostic specificity and diagnostic sensitivity. Therefore, the newly developed PCR-CTPP could be the alternative DNA analysis for diagnosis of α^+ thalassemia carriers 3.7 kb type.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	2
สมมุติฐานของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
นิยามศัพท์	3
ประโยชน์ที่ได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	10
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	10
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	10
การเก็บรวบรวมข้อมูล	10
การวิเคราะห์ข้อมูล	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล	15
ผลความเข้มข้น และค่าความบริสุทธิ์ของตัวอย่างดีเอ็นเอ	15
ผลการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ด้วยวิธี gap PCR	16
ผลลำดับเบสของยีนแอลฟาโกลบินจากตัวอย่างดีเอ็นเอ และผลออกแบบไพรเมอร์	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ผลสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR-CTPP	18
ประสิทธิภาพขั้นต้นของวิธี PCR-CTPP	19
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	21
บทที่ 5 สรุป วิจัยรณผล และข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	28
รูป A	29
รูป B	42
ประวัติผู้วิจัย	44



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ลำดับและตำแหน่งของไพรเมอร์บนฐานข้อมูล gene bank number DQ431198

18



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างของฮีโมโกลบินเอ (HbA)	4
รูปที่ 2.2 แสดงการเรียงตัวของยีนในกลุ่มบีตาและแอลฟาโกลบินและชนิดของฮีโมโกลบิน	5
รูปที่ 2.3 ตำแหน่งการขาดหายไปและการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินที่พบในประเทศไทย	7
รูปที่ 4.1 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 096-159	15
รูปที่ 4.2 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ในตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 140	16
รูปที่ 4.3 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ในตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 1-5	17
รูปที่ 4.4 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของการทำ gradient อดุณหภูมิในขั้นตอน annealing	19
รูปที่ 4.5 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของการประเมินประสิทธิภาพขั้นต้นของวิธี PCR-CTPP	20

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่องในการสร้างโกลบิน (Weatherall and Clegg, 2001) เป็นปัญหาต่อระบบสาธารณสุขของประเทศไทย รวมทั้งประเทศแถบเส้นศูนย์สูตร และกำลังจะเป็นปัญหาของประเทศไทยเนื่องจากประชากรอพยพย้ายถิ่นฐานของประชากรโลก มีการคาดการณ์ว่าแต่ละปีของประชากรไทยมีทารกเกิดใหม่ป่วยเป็นโรคฮีโมโกลินเอช (Hb H disease) พบสูงถึง 7,000 รายต่อปี (บุญเชียร ปานเสถียรกุล, 2546) ซึ่งเป็นโรคแอลฟาธาลัสซีเมียที่มีอาการโลหิตจางปานกลาง แต่จะรุนแรงมากขึ้นเมื่อมีภาวะเครียด หรือภาวะมีไข้ติดเชื้อ ผู้ป่วยโรคฮีโมโกลินเอชได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมจากบิดาและมารดาที่ฝ่ายหนึ่งเป็นพาหะชนิดแอลฟาธาลัสซีเมีย (α^0 thalassemia) และอีกฝ่ายเป็นพาหะชนิดแอลฟาบวธาลัสซีเมีย (α^+ thalassemia) จากรายงานอุบัติการณ์พบผู้ที่เป็นพาหะทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวรวมกันมากถึงร้อยละ 30-40 (Fucharoen and Winichagoon, 2011) ดังนั้นแนวทางป้องกันการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ที่มีประสิทธิภาพคือ การตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียในคู่สมรส ร่วมกับการวางแผนก่อนมีบุตร

การตรวจในงานประจำวันด้วยวิธีทางโลหิตวิทยาที่ประกอบด้วย การตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง (complete blood cell count) ค่า mean corpuscular volume (MCV) ค่า mean corpuscular hemoglobin (MCH) (Giordano et al., 2006; Lafferty et al., 1996; Old, 2003; Pranpanus et al., 2009; Sanchaisuriya et al., 2005; Sirichotiyakul et al., 2005) และการตรวจความทนของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี osmotic fragility test (Sanchaisuriya et al., 2005; Sirichotiyakul et al., 2004) พบความจำเพาะต่อโรคธาลัสซีเมียที่ต่ำ เนื่องจากภาวะโลหิตจางจากสาเหตุอื่น เช่น โรค G-6 PD deficiency และขาดธาตุเหล็กก็ให้ผลบวกได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถแยกผู้ที่มียืนแอลฟาโกลบินปกติออกจากผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาบวธาลัสซีเมียได้ ดังนั้นจึงต้องตรวจด้วยวิธีมาตรฐานคือการตรวจวินิจฉัยระดับยีน (Weatherall and Clegg, 2001) ได้แก่วิธี gap polymerase chain reaction (gap PCR) อย่างไรก็ตาม วิธี gap PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาบวธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป

3.7 กิโลเบส (Smetanina et al., 1996) มีข้อจำกัดคือต้องเพิ่มขยายยีนจำนวน 2 หลอดทดลองที่แยกกัน ระหว่างการขยายยีน α globin gene ปกติและการขยายยีนแอลฟาเบวธาลัสซีเมีย ที่อาจพบปัญหาการควบคุมคุณภาพของการตรวจ

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันวิธีเพิ่มขยายยีนด้วยวิธี loop mediated isothermal amplification (LAMP) (Notomi et al., 2000) มีการใช้แพร่หลายมากขึ้น เนื่องจากมีความไวที่สูง มีประสิทธิภาพดี และมีขั้นตอนในการทำที่ไม่ยุ่งยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สามารถใช้อุณหภูมิเดียวในการทำปฏิกิริยา ดังนั้น จึงสามารถใช้อ่างน้ำ water bath ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธี LAMP ให้สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของสารเคมี hydroxy naphthol blue (HNB) (Goto et al., 2009) มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พัฒนาวิธี LAMP สำหรับตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย ชนิดเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีความไวและความจำเพาะที่สูง (Chomean et al., 2018; Phraephan et al., 2020) อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยการใช้วิธี LAMP ยังมีข้อจำกัดในการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องมีขนาดของท่อนยีนที่ขยายไม่เกิน 200 base pair

จากหลักการเพิ่มขยายยีนด้วยวิธี polymerase chain reaction with confronting two-pair primers หรือ PCR-CTPP (Hamajima et al., 2000) ใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด โดยอาศัยความจำเพาะของไพรเมอร์จำนวน 2 เส้นที่จับกับนิวคลีโอไทด์บนยีนเป้าหมายต่างกัน ดังนั้นเมื่อไพรเมอร์เส้นหนึ่งจับกับยีนแอลฟาโกลบินปกติบนเส้น sense strand ขณะที่ไพรเมอร์อีกเส้นจับกับยีนแอลฟาเบวธาลัสซีเมียบนเส้น antisense strand จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นวิธีสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยแยกคนปกติออกจากพาหะแอลฟาเบวธาลัสซีเมียได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีประสงค์จะพัฒนาวิธี PCR-CTPP สำหรับตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาเบวธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส เพื่อเป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับวิธีการตรวจวินิจฉัยระดับยีนในการป้องกันการเกิดโรคฮีโมโกลบินเอชรายใหม่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธี polymerase chain reaction with confronting two-pair primers สำหรับตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาเบวธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสในประชากร

สมมุติฐานของการวิจัย

วิธี PCR-CTPP ที่พัฒนาขึ้น น่าจะเป็นวิธีตรวจวินิจฉัยระดับยีนสำหรับตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟา บวกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสในประชากรได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการออกแบบและพัฒนาวิธี PCR-CTPP สำหรับตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาบวกธาลัสซีเมีย ชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสเท่านั้น ไม่รวมพาหะแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิดอื่น ๆ เช่นชนิดขาดหายไป 4.2 กิโลเบส ชนิดคอนสแตนท์สปริง โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของนักศึกษาและบุคลากรคณะเทคนิค การแพทย์ ม.รังสิต ที่ได้สกัดไว้เมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2560 และทราบ จีโนไทป์มาแล้วจากวิธี gap PCR

กรอบแนวคิดในการวิจัย

การออกแบบไพรเมอร์ 1 เส้นให้จับได้อย่างจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของพาหะแอลฟาบวก ธาลัสซีเมีย และอีก 1 เส้นให้จับได้อย่างจำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ของคนปกติ โดยอาศัยข้อมูลของลำดับ เบสบนยีนของพาหะแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ที่ได้จากการหาลำดับเบส โดยตรงด้วยวิธี DNA sequencing จะสามารถพัฒนาวิธี PCR-CTPP เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟา บวกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสในประชากรได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

นิยามศัพท์เฉพาะ

Alpha⁺ thalassemia, polymerase chain reaction, confronting two-pair primers

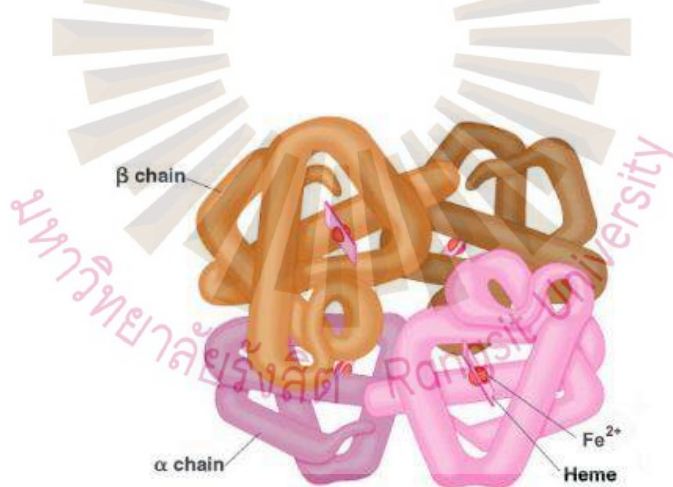
ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้วิธี PCR-CTPP สำหรับตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ที่เป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับการตรวจวินิจฉัยระดับยีนในการป้องกันการเกิด โรคฮีโมโกลบินเอชรายใหม่ต่อไป
2. ทราบลำดับเบสของพาหะแอลฟาบวกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ที่ถูกต้อง และแม่นยำ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา หรือพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยระดับยีนอื่น ๆ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

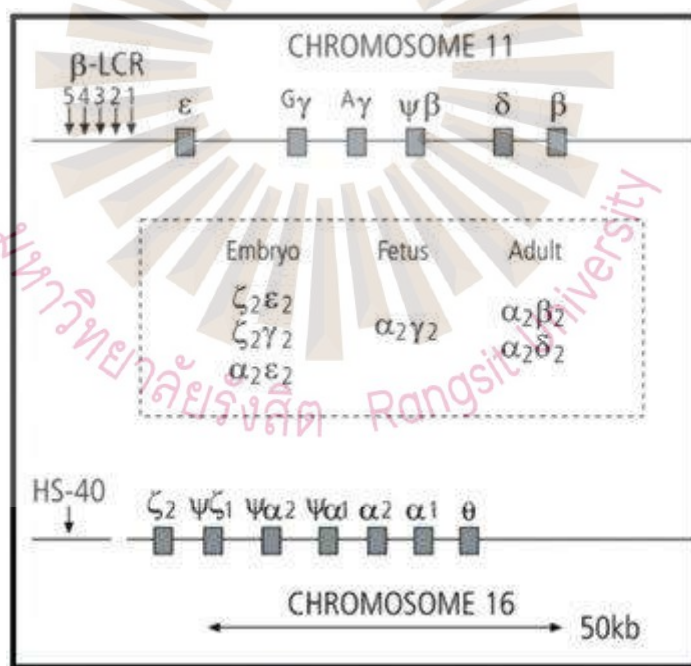
ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่องในการสร้างโกลบินซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮีโมโกลบิน ส่งผลให้ปริมาณฮีโมโกลบินลดน้อยลง (Weatherall and Clegg, 2001) ฮีโมโกลบินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่นำออกซิเจน (oxygen) ไปหล่อเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย โดยในแต่ละอนุของฮีโมโกลบินประกอบด้วยโกลบิน 2 ชนิดคือ โกลบินกลุ่มแอลฟา (α -globin chain cluster) และโกลบินกลุ่มบีตา (β -globin chain cluster) ชนิดละ 2 สายจับอยู่ด้วยกันเป็น tetramer ตัวอย่างเช่น ฮีโมโกลบินเอ (HbA) ประกอบด้วยสายแอลฟาโกลบิน 2 สายและสายบีตาโกลบิน 2 สาย มีสูตรโครงสร้าง คือ $\alpha_2\beta_2$ ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างของฮีโมโกลบินเอ (HbA)

(ที่มา: <http://themedicalbiochemistrypage.org/hemoglobin-myoglobin.html>)

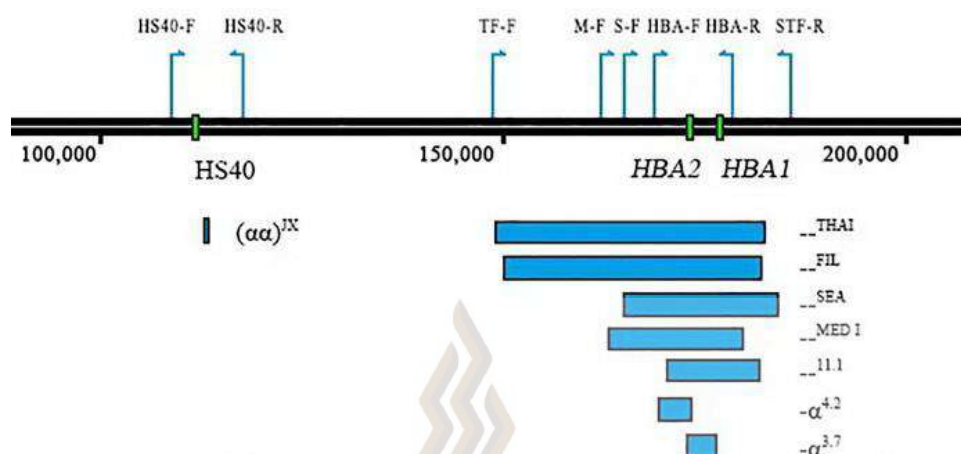
การสร้างสายโกลบินจะถูกควบคุมโดยยีน 2 กลุ่มคือ ยีนกลุ่มแอลฟา (α -globin gene cluster) และยีนกลุ่มบีตา (β -globin gene cluster) โดยยีนกลุ่มแอลฟาอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 ตำแหน่งที่ 16p13.3 ยีนในกลุ่มนี้มีหลายยีนโดยเรียงลำดับกันคือ 5'- ζ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha 2$ - $\psi\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ - θ -3' ยีน ζ สร้างสายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินในระยะตัวอ่อน (embryonic Hb) ส่วนยีน $\alpha 2$ และ $\alpha 1$ สร้างสายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอฟ ($\alpha_2\gamma_2$) ของทารกในครรภ์ และของฮีโมโกลบินเอ ($\alpha_2\beta_2$) ในผู้ใหญ่ ส่วนยีนกลุ่มบีตาอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 ตำแหน่ง 11p15.5 ลำดับของยีนในกลุ่มนี้ คือ 5'- ϵ - γ - $\psi\gamma$ - $\psi\beta$ - δ - β -3' โดยยีน ϵ สร้างสายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินในระยะตัวอ่อน ยีน γ และ $\psi\gamma$ สร้างสายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอฟ และยีน β สร้างสายโกลบินที่เป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเอ (Weatherall and Clegg, 2001) การเรียงตัวของยีนในกลุ่มบีตาและแอลฟาโกลบินและชนิดของฮีโมโกลบินที่เกิดจากยีนทั้งสองแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงการเรียงตัวของยีนในกลุ่มบีตาและแอลฟาโกลบินและชนิดของฮีโมโกลบิน

(ที่มา: https://www.researchgate.net/publication/327023008_thalassemia_and_other_hemolytic_anemia/figures?lo=1)

แอลฟาธาลัสซีเมียส่วนใหญ่เกิดจากยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปเป็นท่อนยาวหลายกิโลเบส (large deletion) ทำให้การสร้างสายโปรตีน (protein) ชนิดแอลฟาโกลบินลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย ความรุนแรงที่เกิดจะขึ้นอยู่กับจำนวนยีนแอลฟาโกลบินที่ขาดหายไป แอลฟาธาลัสซีเมียแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด (1) คือแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α -thalassemia 1) หรือแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมีย (α^0 -thalassemia) แอลฟาธาลัสซีเมียชนิดนี้จะไม่สร้างสายแอลฟาโกลบินเลย ส่วนใหญ่เกิดจากยีนแอลฟาทั้ง 2 โลไซ (loci) ขาดหายไป แอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในเอเชียอาคเนย์ รวมทั้งในประเทศไทยคือชนิดเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asia type) เกิดจากยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปประมาณ 17.5 กิโลเบส และชนิดที่พบบ่อยในประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนคือชนิด Med (Mediterranean type) มียีนขาดหายไปประมาณ 18 กิโลเบส มีชนิดอื่น ๆ ที่พบไม่บ่อยอีกประมาณ 10 ชนิด เช่น ชนิด Thai มีรายงานในคนไทยหลายครอบครัว เกิดจากยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปประมาณ 34 กิโลเบส หากบิดาและมารดาเป็นพาหะแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียทั้งคู่จะมีโอกาสได้บุตรเป็นแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียชนิดโฮโมไซโกต (homozygote, --/--) ทารกจะไม่สามารถสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินได้เลย ทำให้เกิดโรคทารกบวมน้ำชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอฟฟีทาลิส (Hb Bart's hydrops fetalis) มีอาการรุนแรงและเสียชีวิตทั้งหมด อาจเสียชีวิตก่อนหรือหลังคลอดภายใน 24 ชั่วโมง (2) แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α -thalassemia 2) หรือแอลฟาบวธาลัสซีเมีย (α^+ -thalassemia) แอลฟาธาลัสซีเมียชนิดนี้สามารถสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินได้ แต่มีปริมาณที่น้อยกว่าปกติ มีอาการรุนแรงน้อยกว่าแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมีย ความผิดปกติส่วนใหญ่เกิดจากบางส่วนของยีนขาดหายไป เหลือยีนแอลฟาโกลบินเพียงยีนเดียวที่ทำหน้าที่ ชนิดที่พบบ่อยคือชนิดยีนขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ($\alpha^{3.7}$) รองลงมาคือ 4.2 กิโลเบส ($\alpha^{4.2}$) แอลฟาบวธาลัสซีเมียนี้นี้พบได้บ่อยกว่าแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมีย นอกจากจะเกิดจากยีนขาดหายไป ยังมีอีกหลายชนิดที่เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ชนิดที่พบบ่อยคือฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Constant Spring) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการแทนที่เบส (base substitution) 1 ตัว ที่โคดอนหยุด (stop codon) คือเบส U เปลี่ยนเป็น C ทำให้โคดอนหยุดเลื่อนถัดไปอีก 31 โคดอน สายโปรตีนแอลฟาโกลบินที่สร้างได้จึงยาวกว่าปกติและไม่เสถียร เฮเตอร์โอไซโกตเชิงซ้อน (compound heterozygote) ของแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียและแอลฟาบวธาลัสซีเมียจากบิดาและมารดา มีโอกาสได้บุตรที่โรคฮีโมโกลบินเอช (--/ α) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงปานกลาง (thalassemia intermedia) (Weatherall and Clegg, 2001)



รูปที่ 2.3 ตำแหน่งการขาดหายไปและการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาไกลบินที่พบในประเทศไทย

(ดัดแปลงจาก: https://www.frontiersin.org/files/Articles/1076035/fgene-13-1076035-HTML-r1/image_m/fgene-13-1076035-g001.jpg)

จากรายงานอุบัติการณ์ของโรคฮีโมโกลบินเอช ในประเทศไทยพบว่ามีทารกคลอดใหม่เป็นโรคนี้สูงถึงปีละ 7,000 คน (บุญเชียร ปานเสถียรกุล, 2546) ดังที่กล่าวข้างต้นว่าโรคฮีโมโกลบินเอชนี้ เกิดจากบิดาและมารดาที่ฝ่ายหนึ่งเป็นพาหะแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียและอีกฝ่ายเป็นพาหะแอลฟาบวกธาลัสซีเมีย ซึ่งค่าความชุกของพาหะทั้งสองชนิดมีค่าสูงมาก ได้แก่ความชุกของยีนแอลฟาคุนยและแอลฟาบวกธาลัสซีเมียรวมกัน พบมากที่สุดในภาคเหนือสูงถึงร้อยละ 30-40 (Fucharoen and Winichagoon, 2011) แยกเป็นยีนแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียร้อยละ 14 และยีนแอลฟาบวกธาลัสซีเมียร้อยละ 20.5 (Lemmens-Zygulska et al., 1996) รองลงมาเป็นภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบยีนแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียประมาณร้อยละ 15-25.8 (Chaibunruang et al., 2013; Sae-ung et al., 2007) ภาคใต้มีค่าร้อยละ 16.3 (ยีนแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียร้อยละ 4.3 และยีนแอลฟาบวกธาลัสซีเมียร้อยละ 12) (Sriroongrueng et al., 1997) ภาคตะวันออกใน จ.ฉะเชิงเทราพบค่าความชุกร้อยละ 14 (ยีนแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียร้อยละ 2.7 และยีนแอลฟาบวกธาลัสซีเมียร้อยละ 11.3) (Nillakupt et al., 2012) ในภาคกลางมีค่าความชุกของยีนแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียร้อยละ 7.3 (Nathalang et al., 2004) และภาคเหนือตอนล่าง จ.พิษณุโลก พบยีนแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียร้อยละ 4.8 (Wong et al., 2006)

เนื่องจากโรคธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรม และในปัจจุบันการรักษาโรคใช้วิธีปลูกถ่ายไขกระดูกและการรักษาในระดับยีน แต่ยังสามารถทำได้ยากเนื่องจากมีข้อจำกัดในการหาไขกระดูกที่เข้ากันได้กับผู้ป่วย และวิธีการรักษาด้วยสเต็มเซลล์ยังอยู่ในขั้นการวิจัยเท่านั้น การรักษาในปัจจุบันส่วนใหญ่จึงเป็นการรักษาตามอาการ และรักษาภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ตลอดอายุขัยของผู้ป่วยซึ่งต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงและได้ผลจำกัด แนวทางแก้ไขที่ดีที่สุดคือการวางแผนครอบครัวไม่ให้เกิดทารกเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมีย

ขั้นตอนสำคัญในการควบคุมโรคธาลัสซีเมียคือการตรวจกรองและการตรวจวินิจฉัยพาหะเพื่อหาคู่สามีภรรยาที่มีโอกาสได้ลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง แล้วให้ความรู้และคำแนะนำที่ถูกต้องเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียร่วมกับการวางแผนครอบครัว การตรวจกรอง (screening test) พาหะธาลัสซีเมียจะให้ผลดีควรตรวจก่อนแต่งงาน การตรวจกรองพาหะธาลัสซีเมียด้วยวิธีทางโลหิตวิทยาประกอบด้วย การตรวจ complete blood cell count (CBC) แล้วคำนวณค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดงซึ่งประกอบด้วยค่า MCV และค่า MCH โดยคนปกติมีค่า MCV = 75-85 fL และค่า MCH = 26.5-27 pg (Giordano et al., 2006; Lafferty et al., 1996; Old, 2003; Pranpanus et al., 2009; Sanchaisuriya et al., 2005; Sirichotiyakul et al., 2005) ผู้ที่มีค่า MCV และ MCH ต่ำกว่าค่าปกติดังกล่าวจะแสดงถึงมีภาวะซีด (anemia) และมีโอกาสเป็นโรคธาลัสซีเมีย นอกจากนี้ยังมีวิธีตรวจวัดความหนาของเม็ดเลือดแดงในน้ำเกลือที่ความเข้มข้น 0.36-0.45% เรียกว่าวิธี OF test (Sanchaisuriya et al., 2005; Sirichotiyakul et al., 2004) พบว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ที่มีภาวะซีดจะแตกได้ยากกว่าคนปกติ วิธี DCIP precipitation test ใช้หลักการตกตะกอนของ abnormal Hb ได้แก่ HbE และ HbH ด้วยสีย้อม DCIP วิธีทางโลหิตวิทยาดังกล่าวนี้นี้มีความจำเพาะต่อโรคธาลัสซีเมียที่ต่ำ เนื่องจากโรคโลหิตจางจากสาเหตุอื่น ก็สามารถให้ผลบวกได้ เช่น โรค G-6 PD deficiency และโรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก (iron deficiency anemia) เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีทางโลหิตวิทยาก็ยังคงมีความสำคัญในการใช้ตรวจกรองขั้นต้น เนื่องจากมีราคาไม่แพงและทำได้ง่าย

การตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียในระดับยีนจะวินิจฉัยได้แม่นยำที่สุด วิธีดังกล่าวประกอบด้วย วิธี oligonucleotide probe hybridization ที่เรียกว่า reverse dot blot hybridization, วิธี gap-PCR, วิธี LAMP และการหาลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) การตรวจในระดับดีเอ็นเอเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงมากและให้ผลที่แม่นยำ ดังนั้นจึงใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ยีนธาลัสซีเมีย (Weatherall and Clegg, 2001)

มีรายงานวิธีเพิ่มขยายยีนด้วยวิธี polymerase chain reaction with confronting two-pair primers หรือ PCR-CTPP (Hamajima et al., 2000) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ อาศัยหลักการความจำเพาะของไพรเมอร์จำนวน 2 เส้นที่จับกับนิวคลีโอไทด์บนยีนเป้าหมายต่างกัน ได้แก่ไพรเมอร์เส้นหนึ่งจับกับนิวคลีโอไทด์ x บนเส้น sense stand ขณะที่ไพรเมอร์อีกเส้นจับกับนิวคลีโอไทด์ y บนเส้น antisense stand ทำให้สามารถตรวจแยกความแตกต่างของยีนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานการใช้วิธี PCR-CTPP (Intorasoot et al., 2008) สำหรับตรวจหา ยีน HbE ในประชากรไทยภาคเหนือ พบว่าได้ผลสอดคล้องกับวิธีอ้างอิง PCR-RFLP



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากนักศึกษาและบุคลากรคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ทราบจีโนมไทป์ของยีนพาหะแอลฟาเบวธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสจากการวิเคราะห์ระดับ ยีนด้วยวิธี gap PCR ในงานวิจัยก่อนหน้านี้

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เป็นการวิจัยแบบประยุกต์ในสาขาอณูชีววิทยา โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเชิงทดลอง เพื่อออกแบบ และพัฒนาวิธี PCR-CTPP ในการตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาเบวธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 3 รายมาเพิ่มขยายยีนแอลฟาโกลบินด้วยวิธี gap PCR แล้วส่งตรวจลำดับ เบสด้วยวิธี dideoxy termination method แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีน $\alpha 2$ globin gene ที่ขาดหายไปด้วยโปรแกรม Lalign ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 ต่อด้วยการทดลอง หาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR-CTPP แล้วรายงานสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขยาย ยีน อีกทั้งรายงานประสิทธิภาพขั้นต้นเป็นค่าความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยของวิธี

3. การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลจากการทดลอง โดยมีขั้นตอนเป็นลำดับดังนี้

3.1 การวัดค่าความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของตัวอย่างดีเอ็นเอ

ไปเปิดตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 50 μ L ลงในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 950 μ L คิดเป็นค่าเจือจางหรือ dilution factor 1:20 ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยใช้ค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอต้องมีค่า

ความบริสุทธิ์มากกว่า 1.8 สำหรับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ คำนวณโดยใช้สูตร dsDNA ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$

นำตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาณ 500 ng ผสมกับสารละลาย TE buffer ปริมาตรรวม 10 μL จากนั้นทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอใน 0.7% agarose gel ซึ่งมีสารเรืองแสงย้อม DNA RedSafe™ เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลและบันทึกภาพภายใต้แสง UV

3.2 การเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ด้วยวิธี gap PCR (Smetanina et al., 1996)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบว่าเป็นแอลฟาเบวธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส จำนวน 4 ราย มาเพิ่มขยายยีนในหลอด PCR ขนาด 0.2 mL โดยเติมน้ำยาที่ประกอบด้วย 5x GC buffer ปริมาตร 5 μL , 2 mM dNTPs ปริมาตร 2.5 μL , 5 μM 3.7A forward primer (5'-CCC TCC CCC TCg CCA AgT CCA CCC C-3') ปริมาตร 2.5 μL , 5 μM 3.7C reverse primer (5'-ggg ggg Agg CCC AAg ggg CAA gAA-3') ปริมาตร 2.5 μL , 5 units/ μL DNA polymerase ปริมาตร 0.5 μL , 100% DMSO ปริมาตร 2.5 μL , DNA ปริมาตร 1 μL , และ deionized water ให้ครบปริมาตร 50 μL

สำหรับการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ที่ปกติ ทำอีก 1 หลอดเช่นเดียวกับการเพิ่มขยายยีนของผู้ที่เป็นแอลฟาเบวธาลัสซีเมียชนิด แต่เปลี่ยน reverse primer จาก 3.7C เป็น 3.7B (5'-ggg Agg CCC ATC ggg CAg gAg gAA C-3')

นำหลอด PCR reaction ใส่ในเครื่อง BIO-RAD T100™ thermal cycler ด้วยโปรแกรม denature ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกสาย double strand DNA แล้วต่อด้วย 2 steps จำนวน 25 รอบเพื่อเพิ่มขยายยีน ได้แก่ denature ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 10 วินาที และ annealing & extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วต่อด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบ PCR product ขนาด 1,760 bp ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ปริมาตร 5 μL ผสม loading dye ปริมาตร 1 μL ลงใน 1.5% agarose ซึ่งมีสารเรืองแสง

ย้อม DNA RedSafe™ ใน 0.5x TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 40 นาที อ่านผลและบันทึกภาพภายใต้แสง UV

3.3 การหาลำดับเบสของยีนแอลฟาโกลบินในตัวอย่างดีเอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์

ส่ง PCR product ที่เพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene เรียบร้อยแล้วปริมาตร 45 μ L พร้อมกับ forward primer A เพื่อหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxy termination method กับบริษัท Apical Scientific

วิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ขนาด 1,204 bp โดยใช้โปรแกรม Lalign (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/lalign?style=dna&gapext=0>) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน gene bank number DQ431198 เพื่อวิเคราะห์ตำแหน่งยีนที่ขาดหายไปของ $\alpha 2$ globin gene ในผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาบวกลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส

นำลำดับเบสที่ทราบตำแหน่งยีน $\alpha 2$ globin gene ที่ขาดหายไปมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 v. 0.4.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) จำนวน 1 คู่ได้แก่ forward primer F $\alpha 3.7$ และ reverse primer R $\alpha 3.7$ เพื่อเพิ่มขยายยีนในผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาบวกลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส และอีก 1 คู่ได้แก่ forward primer F αN และ reverse primer R αN เพื่อเพิ่มขยายยีนในผู้ที่มี $\alpha 2$ globin gene ปกติ

3.4 การทดลองหาสถานะที่เหมาะสมของวิธี PCR-CTPP

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบว่าเป็นแอลฟาบวกลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส จำนวน 1 ราย และตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบว่ามี $\alpha 2$ globin gene ปกติจำนวน 1 ราย มาเพิ่มขยายยีนในหลอด PCR ขนาด 0.2 mL โดยเติมน้ำยาที่ประกอบด้วย 5x HF buffer ปริมาตร 5 μ L, 2 mM dNTPs ปริมาตร 2.5 μ L, 5 μ M forward primer F $\alpha 3.7$ ปริมาตร 2.5 μ L, 5 μ M reverse primer R $\alpha 3.7$ ปริมาตร 2.5 μ L, 5 μ M forward primer F αN ปริมาตร 2.5 μ L, 5 μ M reverse primer R αN ปริมาตร 2.5 μ L, 5 units/ μ L DNA polymerase ปริมาตร 0.5, DNA ปริมาตร 1 μ L, และ deionized water ให้ครบปริมาตร 25 μ L

นำหลอด PCR reaction ใส่ในเครื่อง BIO-RAD T100™ thermal cycler ด้วยโปรแกรม denature ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกสาย double strand DNA แล้วต่อด้วย 3 steps จำนวน 35 รอบเพื่อเพิ่มขยายยีน ได้แก่ denature ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 10 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 58-68°C เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 20 วินาที แล้วต่อด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบ PCR product ขนาด 670 bp เพื่อวินิจฉัยว่าเป็นพาหะแอลฟาเบกตาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส และขนาด 491 bp เพื่อวินิจฉัยว่ามี $\alpha 2$ globin gene ปกติ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ปริมาตร 10 μ L ผสม loading dye ปริมาตร 2 μ L ลงใน 2% agarose ซึ่งมีสารเรืองแสงย้อม DNA RedSafe™ ใน 0.5x TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 30 นาที อ่านผลและบันทึกภาพภายใต้แสง UV

3.5 การประเมินประสิทธิภาพขั้นต้นของวิธี PCR-CTPP

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวินิจฉัย มาเพิ่มขยายยีนในหลอด PCR ขนาด 0.2 mL โดยเติมน้ำยาที่ประกอบด้วย 5x HF buffer ปริมาตร 5 μ L, 2 mM dNTPs ปริมาตร 2.5 μ L, 5 μ M forward primer F α 3.7 ปริมาตร 2.5 μ L, 5 μ M reverse primer R α 3.7 ปริมาตร 2.5 μ L, 5 μ M forward primer F α N ปริมาตร 2.5 μ L, 5 μ M reverse primer R α N ปริมาตร 2.5 μ L, 5 units/ μ L DNA polymerase ปริมาตร 0.5, DNA ปริมาตร 1 μ L, และ deionized water ให้ครบปริมาตร 25 μ L

นำหลอด PCR reaction ใส่ในเครื่อง BIO-RAD T100™ thermal cycler ด้วยโปรแกรม denature ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกสาย double strand DNA แล้วต่อด้วย 3 steps จำนวน 35 รอบเพื่อเพิ่มขยายยีน ได้แก่ denature ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 10 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 66°C เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 20 วินาที แล้วต่อด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบ PCR product ขนาด 670 bp เพื่อวินิจฉัยว่าเป็นพาหะแอลฟาบกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส และขนาด 491 bp เพื่อวินิจฉัยว่ามี $\alpha 2$ globin gene ปกติ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ปริมาตร 10 μ L ผสม loading dye ปริมาตร 2 μ L ลงใน 2% agarose ซึ่งมีสารเรืองแสงย้อม DNA RedSafe™ ใน 0.5x TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 30 นาที อ่านผลและบันทึกภาพภายใต้แสง UV

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองโดยใช้สถิติพรรณนาในรูปแบบร้อยละของค่าความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยพาหะแอลฟาบกธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ของวิธี PCR-CTPP ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง gap PCR



บทที่ 4

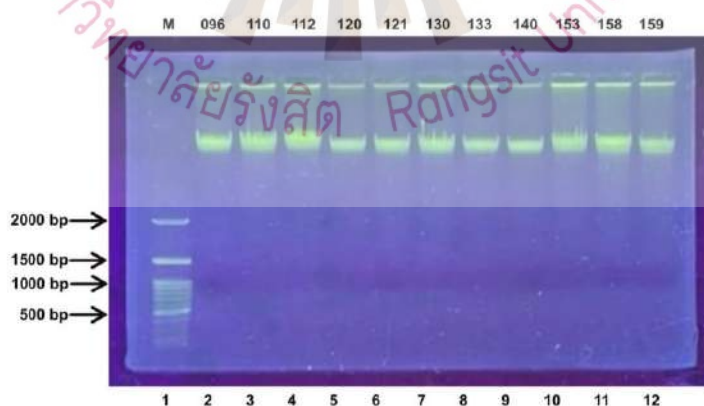
ผลการทดลอง และอภิปรายผล

1. ผลความเข้มข้น และค่าความบริสุทธิ์ของตัวอย่างดีเอ็นเอ

ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมีค่าระหว่าง 207-912 $\mu\text{g/mL}$ และค่าความบริสุทธิ์ของตัวอย่างดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.69-2.01 ประกอบด้วยดีเอ็นเอพาหะแอลฟาบั๊กธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสจำนวน 29 ราย ดีเอ็นเอพาหะแอลฟาบั๊กธาลัสซีเมียชนิดคอนสแตนต์สปริง/ ปากเซจำนวน 8 ราย ดีเอ็นเอพาหะแอลซุนย์บั๊กธาลัสซีเมียชนิดเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จำนวน 10 ราย และดีเอ็นเอคนปกติจำนวน 58 ราย

รูปที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 096 ถึงหมายเลข 159 ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบท่อน genomic DNA จำนวน 1 แถบ สภาพสมบูรณ์ไม่มีการแตกหักของสายดีเอ็นเอ

จากผลความบริสุทธิ์และความเข้มข้น รวมทั้งคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอนี้ แสดงถึงตัวอย่างดีเอ็นเอที่เก็บในคลัง มีคุณภาพดีและมีปริมาณมากพอสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป



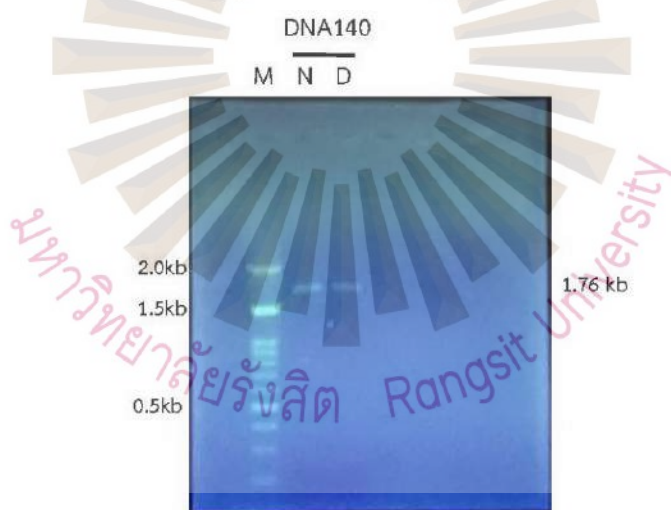
รูปที่ 4.1 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 096-159 ใน 0.7% agarose gel ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 45 นาที

M = DNA marker 100 bp ladder

2. ผลการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ด้วยวิธี gap PCR

ผลการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ของตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 140 ด้วยไพรเมอร์จำนวน 2 ชุดได้แก่ N สำหรับตรวจ $\alpha 2$ globin gene ที่ปกติประกอบด้วย 3.7A primer และ 3.7B primer และ ชุด D สำหรับตรวจ $\alpha 2$ globin gene ที่ขาดหายไป 3.7 กิโลเบสประกอบด้วย 3.7A primer และ 3.7C primer ตรวจพบ PCR product ขนาด 1.76 kb ด้วย primer ทั้ง 2 ชุด หมายถึงตัวอย่าง ดีเอ็นเอนี้เป็นพาหะแอลฟาเบตาทาลัสซีเมียชนิด heterozygous ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ดังนั้นจึงได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene

ผลการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ด้วย 3.7A primer และ 3.7C primer ของตัวอย่าง ดีเอ็นเอจำนวน 5 ราย ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.3 ตรวจพบ PCR product ขนาด 1.76 kb ในตัวอย่าง ดีเอ็นเอหมายเลข 1, 3 และ 5 ที่มีปริมาณมากพอสำหรับส่ง PCR product ปริมาตร 45 μ L เพื่อหาลำดับเบสในขั้นต่อไป

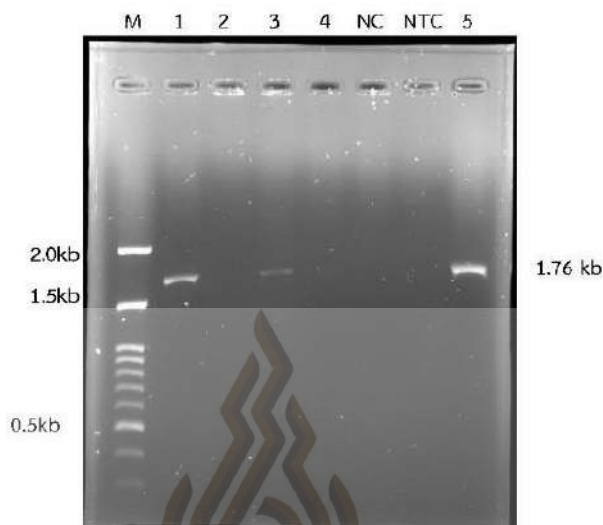


รูปที่ 4.2 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ในตัวอย่าง ดีเอ็นเอหมายเลข 140 ด้วย 1.5% agarose gel ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ เวลา 40 นาที

M = DNA marker 100 bp ladder

N = ตรวจ $\alpha 2$ globin gene ที่ปกติด้วย 3.7A และ 3.7B primer

D = ตรวจ $\alpha 2$ globin gene ที่ขาดหายไป 3.7 กิโลเบสด้วย 3.7A และ 3.7C primer



รูปที่ 4.3 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของการเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ในตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 1-5 ด้วย 1.5% agarose gel ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ เวลา 40 นาที

M = DNA marker 100 bp ladder

NC = Negative control

NCT = No template control

3. ผลลำดับเบสของยีนแอลฟาโกลบินจากตัวอย่างดีเอ็นเอ และผลออกแบบไพรเมอร์

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing ขนาด 1,204 bp เมื่อใช้โปรแกรม Lalign เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 พบตำแหน่งที่ขาดหายไปของ $\alpha 2$ globin gene ในผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมีย ชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ที่ตำแหน่ง 142,554 ถึง 146,358 คิดเป็นความยาว 3,805 bp ดังแสดงในภาคผนวกรูป A

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมีย พบว่าการเชื่อมต่อของยีน $\alpha 2$ globin gene ใหม่หลังยีนขาดหายไป ทำให้เกิดความแตกต่างของลำดับเบสกับผู้ที่มียีนปกติจำนวนเพียง 1 เบสเท่านั้นคือที่ตำแหน่ง 142,554 ในผู้ที่มียีนปกติเป็นเบส a เปลี่ยนเป็นเบส g ในผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย ดังแสดงในภาคผนวกรูป B ดังนั้นผลการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3

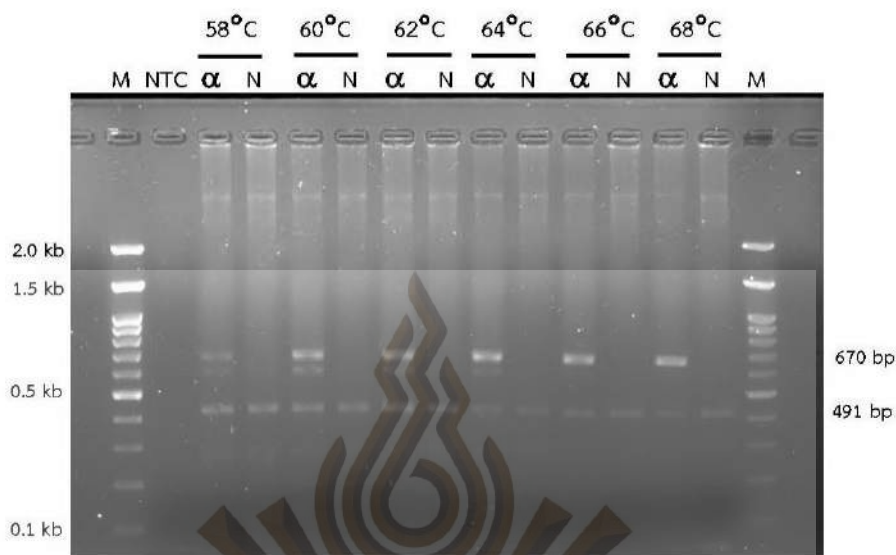
สำหรับวิธี PCR-CTTP ให้เบสตัวสุดท้ายด้าน 3' ของ reverse primer R α 3.7 จับได้อย่างจำเพาะกับเบส g บน α 2 globin gene ของผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบททาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส จึงเพิ่มขยายยีนได้ PCR product ขนาด 670 bp ขณะที่เบสตัวสุดท้ายด้าน 3' ของ forward primer F α N จับได้อย่างจำเพาะกับเบส a บน α 2 globin gene ของผู้ที่มียีนปกติจึงเพิ่มขยายยีนได้ PCR product ขนาด 491 bp ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลำดับและตำแหน่งของไพรเมอร์บนฐานข้อมูล gene bank number DQ431198

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' → 3'	ตำแหน่งบน α 2 globin gene	ขนาด PCR product
F α 3.7	CCC TCC CCC TCG CCA AGT CC	141,904 – 141,923	670 bp
R α 3.7	TTT CGG GCG CCG GAG CGT CC	146,359 – 146,378	
F α N	GCT GAC TTT CTC CCT CGC TAG A	142,533 – 142,554	491 bp
R α N	CCT CCG CAC CAT ACT CGC CA	143,004 – 143,023	

4. ผลสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR-CTPP

ผลการทำ gradient อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ตั้งแต่อุณหภูมิ 58-68°C เป็นเวลา 20 วินาที แสดงในรูปที่ 4.4 พบว่า PCR product ของตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบททาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส (กลุ่ม α) มี 2 ขนาดคือ 670 bp และ 491 bp แสดงถึงยีน α 2 globin gene เป็นชนิด heterozygous คือยีนบนแขน 1 ข้างของโครโมโซมเป็นปกติ ส่วนอีก 1 ข้างมียีนปกติ ขณะที่กลุ่ม N คือตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่มียีน α 2 globin gene ปกติจะพบ PCR product ขนาดเดียวคือ 491 bp จะเห็นว่าที่อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ต่ำคือ 58°C พบ nonspecific band ขนาดประมาณ 600 bp โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะพบ nonspecific band ลดลง ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไปคือ 66°C



รูปที่ 4.4 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของการทำ gradient อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เพื่อเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ใน 2% agarose gel ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ เวลา 30 นาที

M = DNA marker 100 bp ladder

NCT = No template control

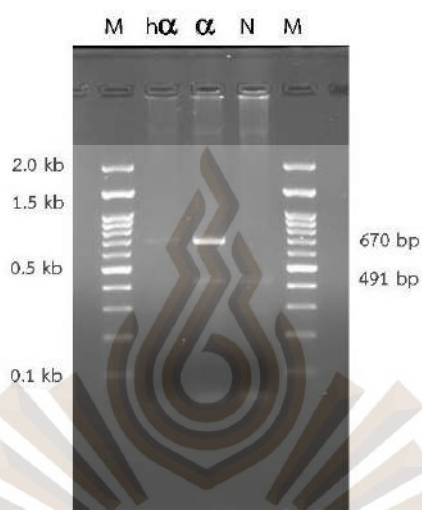
α = ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตทาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส

N = ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่มียีน $\alpha 2$ globin gene ปกติ

5. ประสิทธิภาพขั้นต้นของวิธี PCR-CTPP

ความจำเพาะ (diagnostic specificity) และความไวในการวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) ของวิธี PCR-CTPP ได้ทดสอบขั้นต้นโดยการทดลองตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตทาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสจำนวน 7 ราย และตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่มียีน $\alpha 2$ globin gene ปกติจำนวน 2 ราย พบว่าให้ผลตรงคือ ผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตทาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสชนิด homozygous พบ PCR product ขนาด 670 bp ส่วนผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตทาลัสซีเมีย

ชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสชนิด heterozygous พบ PCR product ทั้งขนาด 670 bp และ 491 bp ขณะที่ผู้ที่มียีน α_2 globin gene ปกติพบ PCR product ขนาด 491 bp เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ผลการทำ agarose gel electrophoresis ของการประเมินประสิทธิภาพขั้นต้นของวิธี PCR-CTPP ใน 2% agarose gel ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ เวลา 30 นาที

M = DNA marker 100 bp ladder

$h\alpha$ = ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสชนิด homozygous

α = ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสชนิด heterozygous

N = ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ที่มียีน α_2 globin gene ปกติ

6. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ประสิทธิภาพขั้นต้นของวิธี PCR-CTPP จากการทดลอง รายงานในรูปค่าความจำเพาะ (diagnostic specificity) และความไวในการวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง gap PCR มีค่าร้อยละ 100

อย่างไรก็ตาม ค่าดังกล่าวนี้ต้องตรวจสอบอย่างถูกต้องตามหลักสถิติคือ ต้องทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนอย่างน้อย 105 ราย เพื่อให้ได้ค่าความจำเพาะ (diagnostic specificity) และความไวในการวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) ที่ถูกต้องแม่นยำมากกว่านี้



บทที่ 5

สรุป วิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุป

จากผลการทดสอบวิธี polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) ที่ออกแบบและพัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส พบว่ามีประสิทธิภาพในขั้นต้นที่ดี น่าจะใช้เป็นวิธีสำหรับตรวจวินิจฉัยระดับยีน เพื่อนำไปสู่การป้องกันการเกิดโรคฮีโมโกลบินเอชรายใหม่ในประชากรต่อไปได้

วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัย เป็นดีเอ็นเอที่เก็บไว้ในคลัง พบว่ามีค่าความบริสุทธิ์และความเข้มข้น รวมทั้งคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ดี อย่างไรก็ตามจำนวนของตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 105 ราย เป็นเพียงจำนวนที่น้อยที่สุดตามหลักสถิติ การทดสอบโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างมากขึ้น จะทำให้ได้ค่าประสิทธิภาพที่ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้อจำกัดของเวลาในการทำงานวิจัยนี้จึงทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอเพียง 9 รายเท่านั้น ทำให้ทราบประสิทธิภาพของวิธี PCR-CTPP ในรูปค่าความจำเพาะ (diagnostic specificity) และความไวในการวินิจฉัย (diagnostic sensitivity) เพียงขั้นต้นเท่านั้น จึงจำเป็นต้องทดสอบเพิ่มเติมต่อไป

การเพิ่มขยายยีน $\alpha 2$ globin gene ด้วยวิธี gap PCR ที่เป็นวิธีอ้างอิง (reference method) เป็นวิธีที่ต้องมีความชำนาญในการทำ อีกทั้งต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมก่อน จึงเป็นข้อจำกัดในการเพิ่มขยายยีนสำหรับเป็นตัวอย่างในการหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxy termination method ทำให้ได้ทราบตำแหน่งของยีน $\alpha 2$ globin gene ที่ขาดหายไปอย่างถูกต้อง เพื่อนำไปสู่การออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ส่งบริษัทเพื่อหาลำดับเบสในตัวอย่างดีเอ็นเอเพียง 3 ราย จึงอาจไม่เป็นตัวแทนของผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบสในประชากรไทยทั้งหมดได้ ดังนั้นการเพิ่มตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับเบสที่มากขึ้น จะเป็นการยืนยันตำแหน่งและขนาดของยีน $\alpha 2$ globin gene ที่ขาดหายไป 3.7 กิโลเบสได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

คณะผู้วิจัยได้เสนอการออกแบบและพัฒนาวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในโครงร่างขอทุนวิจัยเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีเพิ่มขยายยีนแบบ isothermal amplification ที่มีข้อดีคือสามารถเพิ่มขยายยีนด้วยหลักการใช้อุณหภูมิเดียวในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้เครื่องเพิ่มขยายสารพันธุกรรม PCR thermal cycler โดยอ่านผลการเรืองแสงภายใต้แสงยูวี หรือประยุกต์ให้อ่านผลด้วยตาเปล่าได้ แต่เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจากตัวอย่างดีเอ็นเอ พบว่ามีเพียง 1 เบสที่แตกต่างกันระหว่างผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส กับผู้ที่มียีน $\alpha 2$ globin gene ปกติ จึงไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิธี LAMP ให้มีความจำเพาะได้ ถึงแม้วิธี isothermal amplification ชนิดอื่นได้แก่วิธี recombinase polymerase amplification (RPA) และวิธี polymerase spiral reaction (PSR) ใช้ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่เช่นเดียวกับวิธี classical PCR แต่มีข้อจำกัดคือต้องมีขนาด PCR product ไม่เกิน 200 bp ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องปรับเปลี่ยนวิธีตรวจวินิจฉัยระดับยีนเป็นวิธี PCR-CTPP

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิธี PCR-CTPP เพื่อให้มีความจำเพาะกับเบสที่แตกต่างกันเพียง 1 เบสระหว่างผู้ที่เป็นพาหะแอลฟาเบตาธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป 3.7 กิโลเบส กับผู้ที่มียีน $\alpha 2$ globin gene ปกตินั้นต้องอาศัยความชำนาญ เนื่องจากใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ในหลอดทดลองเดียวกัน จึงต้องออกแบบให้ไพรเมอร์มีค่า melting temperature (T_m) ที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังต้องใช้ไพรเมอร์ระดับ HPLC grade เนื่องจากต้องการความจำเพาะของเบสตัวสุดท้ายปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์เพื่อจับกับ 1 เบสที่แตกต่างกัน เพราะไพรเมอร์ที่เกรดต่ำกว่านี้จะมีโอกาสได้เบสตัวสุดท้ายปลายด้าน 3' ไม่ถูกต้อง ส่งผลให้ความจำเพาะต่อเบสเป้าหมายลดต่ำลง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จำเป็นต้องมีการทดลองกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์แล้ว เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์อีกด้วย หากผลการเพิ่มขยายยีนไม่เป็นตามที่คาดไว้ มีความจำเป็นต้องออกแบบและทดลองกับไพรเมอร์คู่ใหม่และทดลองซ้ำ ๆ อีกเพื่อให้ได้ผลการเพิ่มขยายยีนอย่างจำเพาะ

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR-CTPP ที่พัฒนาขึ้นนี้ ได้ใช้สภาวะและค่าความเข้มข้นของสารเคมีที่แนะนำในคู่มือแนะนำของบริษัท Thermo Scientific ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีเพียงการทดลองหาค่าอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่เหมาะสมเพียงอย่างเดียว ซึ่งยังขาดการทดลองความ

เข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่คู่มือแนะนำให้ปรับค่าความเข้มข้นเพิ่มทีละ 0.2 mM กรณีมีความจำเป็น และเวลาในขั้นตอน denaturation อยู่ในช่วง 5-10 วินาที ขั้นตอน annealing อยู่ในช่วง 10-30 วินาทีและขั้นตอน extension อยู่ในช่วง 15-30 วินาที/ กิโลเบสของ PCR product เพื่อให้การ titration ของวิธี PCR-CTPP มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น



เอกสารอ้างอิง

- บุญเชียร ปานเสถียรกุล. (2546). *ธาลัสซีเมียและการให้คำปรึกษาแนะนำ*. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คุรุสภา.
183 หน้า
- Chaibunruang, A., *et al.* (2013). Molecular and hematological studies in a large cohort of alpha⁰-thalassemia in northeast Thailand: data from a single referral center. *Blood Cells Molecular and Disease*. 51(2): 89-93.
- Chomean, S., Pholyiam, K., Thamwarokun, A., and Kaset, C. (2018). Development of Visual Detection of α -Thalassemia-1 (the -^{SEA} Deletion) Using pH-Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Hemoglobin*. 42:171-77.
- Fucharoen, S., and Winichagoon, P. (2011). Haemoglobinopathies in southeast Asia. *Indian J Med Res*. 134: 498-506.
- Giordano, P.C., *et al.* (2006). Carrier diagnostics and prevention of hemoglobinopathies in early pregnancy in The Netherlands: a pilot study. *Prenatal Diagnosis*. 26(8): 719-24.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., and Hanaki, K. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 46(3):167- 72.
- Hamajima, N., Saito, T., Matsuo, K., Kozaki, K., Takahashi, T., and Tajima, K. (2000). Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping. *Japanese Journal of Cancer Research*. Sep;91(9):865-8.
- Intorasoot, S., Thongpung, R., Tragoolpua, K., and Chottayaporn, M. (2008). Hemoglobin E detection using PCR with confronting two-pair primers. *The Journal of the Medical Association of Thailand*. Nov;91(11):1677-80.

- Lafferty, J. D., Crowther, M.A., Ali, M.A., and Levine, M. (1996). The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. *American Journal of Clinical Pathology*. **106**(2): 201-5.
- Lemmens-Zygulska, M., Eigel, A., Helbig, B., Sanguansermsri, T., Horst, J., and Flatz, G. (1996). Prevalence of alpha-thalassemias in northern Thailand. *Human Genetics*. **98**(3): 345-7.
- Nathalang, O., Arnutti, P., and Nillakupt, K. (2004). Thalassemia screening among Royal Thai Army medical cadets. *Military Medicine*. **169**(4): 274-6.
- Nillakupt, K., *et al.* (2012). Prevalence and hematological parameters of thalassemia in Tha Kradarn subdistrict Chachoengsao Province, Thailand. *The Journal of the Medical Association of Thailand*. **95** Suppl 5: S124-32.
- Notomi, T., *et al.* (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. **28**:e63.
- Old, J.M. (2003). Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Reviews*. **17**(1): 43-53.
- Phraephan, S., Watanasatitarp, S., and Intorasoot, S. (2020). Naked eye detection of α thalassemia --^{SEA} type using hydroxynaphthol blue loop-mediated isothermal amplification. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. Vol: **8**, Issue: E, Page: 236-240
- Pranpanus, S., Sirichotiyakul, S., Srisupundit, K., and Tongsong, T. (2009). Sensitivity and specificity of mean corpuscular hemoglobin (MCH): for screening alpha-thalassemia-1 trait and beta-thalassemia trait. *The Journal of the Medical Association of Thailand*. **92**(6): 739-43.
- Sae-ung, N., Fucharoen, G., Sanchaisuriya, K., and Fucharoen, S. (2007). Alpha⁰-thalassemia and related disorders in northeast Thailand: a molecular and hematological characterization. *Acta Haematologica*. **117**(2): 78-82.

- Sanchaisuriya, K., *et al.* (2005). A reliable screening protocol for thalassemia and hemoglobinopathies in pregnancy: an alternative approach to electronic blood cell counting. *American Journal of Clinical Pathology*. **123**(1): 113-8.
- Sirichotiyakul, S., Maneerat, J., Sa-nguansermisri, T., Dhananjayanonda, P., and Tongsong, T. (2005). Sensitivity and specificity of mean corpuscular volume testing for screening for alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia traits. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. **31**(3): 198-201.
- Sirichotiyakul, S., Tantipalakorn, C., Sanguansermisri, T., Wanapirak, C., and Tongsong, T. (2004). Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. **86**(3): 347-50.
- Sriroongrueng, W., Pornpatkul, M., Panich, V., and Fucharoen, S. (1997). Alpha-thalassemia incidence in southern Thailand by restriction endonuclease analysis of globin DNA from placental blood at Songklanagarind Hospital. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. **28** Suppl 3: 93-6.
- Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. *The thalassemia syndromes*, 4th ed. Oxford, Blackwell Science Ltd, 2001, ISBN 0-86542-664-3.
- Wong, P., *et al.* (2006). Risk of a couple having a child with severe thalassemia syndrome, prevalence in lower northern Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. **37**(2): 366-9.

ภาคผนวก



>>EMBOSS_001 (1228 nt)
 Waterman-Eggert score: 8121; 204.6 bits; E(1) < 1.8e-55
 22.5% identity (22.5% similar) in 5343 nt overlap (49-5389:2-1228)

```

      50      60      70      80      90     100
EMBOSS CCCTCACCTACATTCTGCAACCACAGGGGCTTCTCTCCCCTGTCCTTTCCCTACCCAG-
      .....
EMBOSS CCCTCACCTACATTCTGCAACCACAGGGGCTTCTCTCCCCTGTCCTTTCCCTACCCACC
      10      20      30      40      50      60

      110     120     130     140     150     160
EMBOSS AGCCAAGTTTGTTTATCTGTTTACAACCAGTATTTACCTAGCAAGTCTTCCATCAGATAG
      .....
EMBOSS AGCCAAGTTTGTTTATCTGTTTACAACCAGTATTTACCTAGCAAGTCTTCCATCAGATAG
      70      80      90     100     110     120

      170     180     190     200     210     220
EMBOSS CATTTGGAGAGCTGGGGGTGTCACAGTGAACCACGACCTCTAGGCCAGTGGGAGAGTCAG
      .....
EMBOSS CATTTGGAGAGCTGGGGGTGTCACAGTGAACCACGACCTCTAGGCCAGTGGGAGAGTCAG
      130     140     150     160     170     180

      230     240     250     260     270     280
EMBOSS TCACACAAACTGTGAGTCCATGACTTGGGGCTTAGCCAGCACCCACCACCCACGCGCCA
      .....
EMBOSS TCACACAAACTGTGAGTCCATGACTTGGGGCTTAGCCAGCACCCACCACCCACGCGCCA
      190     200     210     220     230     240

      290     300     310     320     330     340
EMBOSS CCCCACAACCCCGGGTAGAGGAGTCTGAATCTGGAGCCGCCCCAGCCCAGCCCCGTGCT
      .....
EMBOSS CCCCACAACCCCGGGTAGAGGAGTCTGAATCTGGAGCCGCCCCAGCCCAGCCCCGTGCT
      250     260     270     280     290     300

      350     360     370     380     390     400
EMBOSS TTTTGCCTGCTGGTGTGTTGTTTCCTTCCCGGTGCCTGTCACTCAAGCACACTAGTGACTAT
      .....
EMBOSS TTTTGCCTGCTGGTGTGTTGTTTCCTTCCCGGTGCCTGTCACTCAAGCACACTAGTGACTAT
      310     320     330     340     350     360

```

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198

```

      410      420      430      440      450      460
EMBOSS CGCCAGAGGGAAAGGGAGCTGCAGGAAGCGAGGCTGGAGAGCAGGAGGGGCTCTGCGCAG
      .....
EMBOSS CGCCAGAGGGAAAGGGAGCTGCAGGAAGCGAGGCTGGAGAGCAGGAGGGGCTCTGCGCAG
      370      380      390      400      410      420

      470      480      490      500      510      520
EMBOSS AAATTCTTTTGAGTTCCTATGGGCCAGGGCGTCCGGGTGCGCGCATTCTCTCCGCCCCA
      .....
EMBOSS AAATTCTTTTGAGTTCCTATGGGCCAGGGCGTCCGGGTGCGCGCATTCTCTCCGCCCCA
      430      440      450      460      470      480

      530      540      550      560      570      580
EMBOSS GGATTGGGCGAAGCCTCCCGGCTCGCACTCGCTCGCCCGTGTGTTCCCCGATCCCGCTGG
      .....
EMBOSS GGATTGGGCGAAGCCTCCCGGCTCGCACTCGCTCGCCCGTGTGTTCCCCGATCCCGCTGG
      490      500      510      520      530      540

      590      600      610      620      630      640
EMBOSS AGTCGATGCGCGTCCAGCGCGTGCCAGGCCGGGGCGGGGGTGCGGGGCTGACTTTCTCCCT
      .....
EMBOSS AGTCGATGCGCGTCCAGCGCGTGCCAGGCCGGGGCGGGGGTGCGGGGCTGACTTTCTCCCT
      550      560      570      580      590      600

      650      660      670      680      690      700
EMBOSS CGCTAGAGACGCTCCGGCGCCCCGAAAGGAAAGGGTGGCGCTGCGCTCCGGGGTGACGAG
      .....
EMBOSS CGCTAG-----

      710      720      730      740      750      760
EMBOSS CCGACAGCGCCCGACCCAACGGGCCCGCCAGCGCCGCTACCGCCCTGCTCCCGG
EMBOSS -----

      770      780      790      800      810      820
EMBOSS GCGAGCGGGATGGGCGGGAGTGGAGTGGCGGGTGGAGGGTNGGAGACGTCCTGGCCCCCG
EMBOSS -----

```

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

830 840 850 860 870 880
 EMBOSS CCCCCGCTGCACCCCCAGGGGAGGCCGAGCCCGCCGCCCGGCCCGCGCAGGCCCGCCC
 EMBOSS -----
 890 900 910 920 930 940
 EMBOSS GGGACTCCCCTGCGGTCCAGGCCGCGCCCCGGGCTCCGCGCCAGCCAATGAGCGCCGCC
 EMBOSS -----
 950 960 970 980 990 1000
 EMBOSS GGCCGGGCGTGCCCCGCGCCCCAAGCATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCT
 EMBOSS -----
 1010 1020 1030 1040 1050 1060
 EMBOSS TCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCACCATGGTGCTGTCTCTGCGGACAAGACCA
 EMBOSS -----
 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 EMBOSS ACGTCAAGGCCGCTGGGGTAAGGTCGGCGCGCACGCTGGCGAGTATGGTGCGGAGGCC
 EMBOSS -----
 1130 1140 1150 1160 1170 1180
 EMBOSS TGGAGANGGTGAGGCTCCCTCCCCTGCTCCGACCCGGGCTCCTCGCCCGCCCGGACCCAC
 EMBOSS -----
 1190 1200 1210 1220 1230 1240
 EMBOSS AGGCCACCCTCAACCGTCCTGGCCCCGGACCCAAACCCCAACCCCTCACTCTGCTTCTCCC
 EMBOSS -----
 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 EMBOSS CGCAGGATGTTCTGTCTTCCCCACCACCAAGACCTACTTCCCGCACTTCGACCTGAGC
 EMBOSS -----

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$
 globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

1310 1320 1330 1340 1350 1360
 EMBOSS CACGGCTCTGCCCAGGTAAAGGGCCACGGCAAGAAGGTGGCCGACGCGCTGACCAACGCC
 EMBOSS -----

1370 1380 1390 1400 1410 1420
 EMBOSS GTGGCGCACGTGGACGACATGCCCAACGCGCTGTCCGCCCTGAGCGACCTGCACGCGCAC
 EMBOSS -----

1430 1440 1450 1460 1470 1480
 EMBOSS AAGCTTCGGGTGGACCCGGTCAACTTCAAGGTGAGCGGCGGGCCGGGAGCGATCTGGGTC
 EMBOSS -----

1490 1500 1510 1520 1530 1540
 EMBOSS GAGGGGCGAGATGGCGCCTTCTCTCAGGGCAGAGGATCACGCGGGTTGCGGGAGGTGTA
 EMBOSS -----

1550 1560 1570 1580 1590 1600
 EMBOSS GCGCAGGCGGCGGCTGCGGGCCTGGGCCGCACTGACCCTCTTCTCTGCACAGCTCCTAAG
 EMBOSS -----

1610 1620 1630 1640 1650 1660
 EMBOSS CCACTGCCTGCTGGTGACCCTGGCCGCCACCTCCCCGCCGAGTTCACCCCTGCGGTGCA
 EMBOSS -----

1670 1680 1690 1700 1710 1720
 EMBOSS CGCCTCCCTGGACAAGTTCCTGGCTTCTGTGAGCACCGTGCTGACCTCCAAATACCGTTA
 EMBOSS -----

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$
 globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

1730 1740 1750 1760 1770 1780
 EMBOSS AGCTGGAGCCTCGGTAGCCGTTCTCCTGCCGCTGGGCCTCCCAACGGGCGCTCCTCCC
 EMBOSS -----

1790 1800 1810 1820 1830 1840
 EMBOSS CTCCTTGACCGGCCCTTCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAGCCTGTGTG
 EMBOSS -----

1850 1860 1870 1880 1890 1900
 EMBOSS TGCCTGGGTTCTCTCTGTCCCGGAATGTGCCAACAATGGAGGTGTTTACCTGTCTCAGAC
 EMBOSS -----

1910 1920 1930 1940 1950 1960
 EMBOSS CAAGGACCTCTCTGCAGCTGCATGGGGCTGGGGAGGGAGAACTGCAGGGAGTATGGGAGG
 EMBOSS -----

1970 1980 1990 2000 2010 2020
 EMBOSS GGAAGCTGAGGTGGGCCTGCTCAAGAGAAGGTGCTGAACCATCCCCTGTCCTGAGAGGTG
 EMBOSS -----

2030 2040 2050 2060 2070 2080
 EMBOSS CCAGGCCTGCAGGCAGTGGCTCAGAAGCTGGGGAGGAGAGAGGCATCCAGGGTTCTACTC
 EMBOSS -----

2090 2100 2110 2120 2130 2140
 EMBOSS AGGGAGTCCCAGCATCGCCACCCTCCTTTGAAATCTCCCTGGTTGAACCCAGTTAACATA
 EMBOSS -----

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

2150 2160 2170 2180 2190 2200
 EMBOSS CGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAACAACTAGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGC
 EMBOSS -----

2210 2220 2230 2240 2250 2260
 EMBOSS AAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTCATTCCCACCCCTTCCTGCCAGAGGGTAGGTGGC
 EMBOSS -----

2270 2280 2290 2300 2310 2320
 EMBOSS TGGAGTGAGGGTGCTGGCCCTACTCACACTTCCTGTGTACGGTGACCCTCTGAGAGCAG
 EMBOSS -----

2330 2340 2350 2360 2370 2380
 EMBOSS CCCAGTCAGTGGGGAAGGAGGAAGGGGCTGGGATGCTCACAGCCGGCAGCCCACACCTGG
 EMBOSS -----

2390 2400 2410 2420 2430 2440
 EMBOSS GGAGACTCTTCAGCAGAGCACCTTGCGGCCTTACTCCTGCACGTCTCCTGCAGTTTGTAA
 EMBOSS -----

2450 2460 2470 2480 2490 2500
 EMBOSS GGTGCATTCAGAACTCACTGTGTGCCAGCCCTGAGCTCCCAGCTAATTGCCCCACCCAG
 EMBOSS -----

2510 2520 2530 2540 2550 2560
 EMBOSS GGCCTCTGGGACCTCCTGGTGCTTCTGCTTCCTGTGCTGCCAGCAACTTCTGGAAACGTC
 EMBOSS -----

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$
 globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

2570 2580 2590 2600 2610 2620
 EMBOSS CCTGTCCCCGGTGCTGAAGTCCTGGAATCCATGCTGGGAAGTTGCACAGCCCATCTGGCT
 EMBOSS -----

2630 2640 2650 2660 2670 2680
 EMBOSS CTCAGCCAGCCTAGGAACATGAGCAGCACTTCCAACCCAGTCCCTGCCCCACAGCAAGCC
 EMBOSS -----

2690 2700 2710 2720 2730 2740
 EMBOSS TCCCCCTCCCACTCACAGTACTGGATTGAGCTTTGGGGAGGGTGGAGAGGACCCTGTCA
 EMBOSS -----

2750 2760 2770 2780 2790 2800
 EMBOSS CTGCTTTCCTTCTGGACATGGACCTCTCTGAATTGTTGGGGAGTTCCTCCCCTCTCCAC
 EMBOSS -----

2810 2820 2830 2840 2850 2860
 EMBOSS CACCCGCTCTTCCTGCGCCTCACAGCCCAGAGCATTGTTATTTACAGCAGAAACACTTTAA
 EMBOSS -----

2870 2880 2890 2900 2910 2920
 EMBOSS AAAATAAACTAAAATCCGACAGGCACGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGA
 EMBOSS -----

2930 2940 2950 2960 2970 2980
 EMBOSS GGCCGAGGTGGGAGGATCACCTGAGGTCGGGAGTTTGAGACCACCCTGATCAACATGTAG
 EMBOSS -----

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$
 globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

2990 3000 3010 3020 3030 3040
 EMBOSS AAACCCCATCTATACTAAAAATACAAAATCAGCCGGGCATGGTGGCCCATGCCTGTAAAC
 EMBOSS -----
 3050 3060 3070 3080 3090 3100
 EMBOSS CCACCTACTCCGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCATTTTAACCAAGGAGGCAGAGGTTGCAG
 EMBOSS -----
 3110 3120 3130 3140 3150 3160
 EMBOSS TGAGCTAAGATCACACCATTGCACTCCAGCCTGGAAAACAACAGCGAAACTCCGCCTCAA
 EMBOSS -----
 3170 3180 3190 3200 3210 3220
 EMBOSS AAAAAAAAAAGCCCCACATCTTATCTTTTTTTTTTCTTCAGGCTGTGGGCAGAGTCAG
 EMBOSS -----
 3230 3240 3250 3260 3270 3280
 EMBOSS AAGAGGGTGGCAGACAGGGAGGGGAAATGAGAAGATCCAACGGGGGAAGCATTGCTAAGC
 EMBOSS -----
 3290 3300 3310 3320 3330 3340
 EMBOSS TAGTCGGAGCTACTTCCTTCTCTGCCAAGGCAGCTTACCCTGGCTTGCTCCTGGACACC
 EMBOSS -----
 3350 3360 3370 3380 3390 3400
 EMBOSS CAGGGCAGGGCCTGAGTAAGGGCCTGGGGAGACAGGGCAGGGAGCAGGCTGAAGGGTGCT
 EMBOSS -----

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$
 globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

3410 3420 3430 3440 3450 3460
EMBOSS GACCTGATGCACTCCTCAAAGCAAGATCTTCTGCCAGACCCCCAGGAAATGACTTATCAG

EMBOSS -----

3470 3480 3490 3500 3510 3520
EMBOSS TGATTTCTCAGGCTGTTTTCTCCTCAGTACCATCCCCCAAAAACATCACTTTTTCATGC

EMBOSS -----

3530 3540 3550 3560 3570 3580
EMBOSS ACAGGGATGCACCCACTGGCACTCCTGCACCTCCCACCCTTCCCCAGAAGTCCACCCCTT

EMBOSS -----

3590 3600 3610 3620 3630 3640
EMBOSS CCTTCCTCACCTGCAGGAGCTGGCCAGCCTCATCACCCCAACATCTCCCCACCTCCATT

EMBOSS -----

3650 3660 3670 3680 3690 3700
EMBOSS CTCCAACCACAGGGCCCTTGTCCTCTGTCCTTTCCCCTCCCGAGCCAAGCCTCCTCC

EMBOSS -----

3710 3720 3730 3740 3750 3760
EMBOSS CTCCTCCACCTCCTCCACCTAATACATATCCTTAAGTCTCACCTCCTCCAGGAAGCCCTC

EMBOSS -----

3770 3780 3790 3800 3810 3820
EMBOSS AGACTAACCCTGGTCCCCTTGAATGCCTCGTCCACACCTCCAGACTTCCTCAGGGCCTGT

EMBOSS -----

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

3830 3840 3850 3860 3870 3880
EMBOSS GATGAGGTCTGCACCTCTGTGTGTACTTGTGTGATGGTTAGAGGACTGCCTACCTCCCAG

EMBOSS -----

3890 3900 3910 3920 3930 3940
EMBOSS AGGAGGTTGAATGCTCCAGCCGGTCCAGCTATTGCTTTGTTTACCTGTTTAACCAAGTAT

EMBOSS -----

3950 3960 3970 3980 3990 4000
EMBOSS TTACCTAGCAAGTCTTCCATCAGATAGCATTTGGAGAGCTGGGGGTGTCACAGTGAACCA

EMBOSS -----

4010 4020 4030 4040 4050 4060
EMBOSS CGACCTCTAGGCCAGTGGGAGAGTCAGTCACACAACTGTGAGTCCATGACTTGGGGCTT

EMBOSS -----

4070 4080 4090 4100 4110 4120
EMBOSS AGCCAGCACCCACCCACCCACGCGCCACCCACAAACCCCGGGTAGAGGAGTCTGAATCTG

EMBOSS -----

4130 4140 4150 4160 4170 4180
EMBOSS GAGCCGCCCCAGCCCAGCCCCGTGCTTTTTGCGTCCTGGTGTTTATTCCTTCCCGGTGC

EMBOSS -----

4190 4200 4210 4220 4230 4240
EMBOSS CTGTCACTCAAGCACACTAGTGACTATCGCCAGAGGGAAGGGAGCTGCAGGAAGCGAGG

EMBOSS -----

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

```

      4250      4260      4270      4280      4290      4300
EMBOSS CTGGAGAGCAGGAGGGGCTCTGCGCAGAAATTCTTTTGAGTTCCTATGGGCCAGGGCGTC

EMBOSS -----

      4310      4320      4330      4340      4350      4360
EMBOSS CGGGTGCGCGCATTCTCTCCGCCCCAGGATTGGGCGAAGCCTCCCGGCTCGCACTCGCT

EMBOSS -----

      4370      4380      4390      4400      4410      4420
EMBOSS CGCCCGTGTTCCCGGATCCCGCTGGAGTCGATGCGCGTCCAGCGCGTGCCAGGCCGGG

EMBOSS -----

      4430      4440      4450      4460      4470      4480
EMBOSS GCGGGGGTGCGGGCTGACTTTCTCCCTCGCTAGGGACGCTCCGGCGCCCGAAAGGAAAGG
      .....
EMBOSS -----GGACGCTCCGGCGCCCGAAAGGAAAGG
      610      620      630

      4490      4500      4510      4520      4530      4540
EMBOSS GTGGCGCTGCGCTCCGGGGTGACGAGCCGACAGCGCCCGACCCCAACGGGCCGGCCCCG
      .....
EMBOSS GTGGCGCTGCGCTCCGGGGTGACGAGCCGACAGCGCCCGACCCCAACGGGCCGGCCCCG
      640      650      660      670      680      690

      4550      4560      4570      4580      4590      4600
EMBOSS CCAGCGCCGCTACCGCCCTGCTCCCGGGCGAGCGGGATGGGCGGGAGTGGAGTGGCGGGT
      .....
EMBOSS CCAGCGCCGCTACCGCCCTGCTCCCGGGCGAGCGGGATGGGCGGGAGTGGAGTGGCGGGT
      700      710      720      730      740      750

      4610      4620      4630      4640      4650      4660
EMBOSS GGAGGGTGGAGACGTCCTGGCCCCCGCCCCGCGTGACCCCCAGGGGAGGCCGAGCCCGC
      .....
EMBOSS GGAGGGTGGAGACGTCCTGGCCCCCGCCCCGCGTGACCCCCAGGGGAGGCCGAGCCCGC
      760      770      780      790      800      810

```

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

```

      4670      4680      4690      4700      4710      4720
EMBOSS CGCCCGGCCCGCGCAGGCCCGCCGGGACTCCCCTGCGGTCCAGGCCGCGCCCGGGC
      :
EMBOSS CGCCCGGCCCGCGCAGGCCCGCCGGGACTCCCCTGCGGTCCAGGCCGCGCCCGGGC
      820      830      840      850      860      870

      4730      4740      4750      4760      4770      4780
EMBOSS TCCGCGCCAGCCAATGAGCGCCGCCGGGCGTGCCCCGCGCCCCAAGCATAAACC
      :
EMBOSS TCCGCGCCAGCCAATGAGCGCCGCCGGGCGTGCCCCGCGCCCCAAGCATAAACC
      880      890      900      910      920      930

      4790      4800      4810      4820      4830      4840
EMBOSS CTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACCAT
      :
EMBOSS CTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACCAT
      940      950      960      970      980      990

      4850      4860      4870      4880      4890      4900
EMBOSS GGTGCTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCAAGGCCGCCTGGGGTAAGGTCGGCGCGCA
      :
EMBOSS GGTGCTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTCAAGGCCGCCTGGGGTAAGGTCGGCGCGCA
      1000      1010      1020      1030      1040      1050

      4910      4920      4930      4940      4950      4960
EMBOSS CGCTGGCGAGTATGGTGCGGAGGCCCTGGAGAGGTGAGGCTCCCTCCCCTGCTCCGACCC
      :
EMBOSS CGCTGGCCAATATGGTGCGGAAGCCCTGGAGAGGTGAGGCTCCCTCCCCTGCTCGAACCG
      1060      1070      1080      1090      1100      1110

      4970      4980      4990      5000      5010      5020
EMBOSS GGGTCCTCGCCGCGCGGACCCACAGGCCACCCTCAACCGTCCTGGCCCCGGACCCAAA
      :
EMBOSS GGGTTCCTCGCCGCGCGGAACCCAAGGGCACCTNAACCGGTCTGGGCCCGGAACCAAAA
      1120      1130      1140      1150      1160      1170

```

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)

```

      5030      5040      5050      5060      5070      5080
EMBOSS  CCCCACCCCTCAC-TCTGCTTCTCCCCGCAGGATGTTCTGTCTTCCCCACCACCAAGA
      :::: :::: :  :  :: :: :::::::::::::: ::::::::::::::
EMBOSS  ACCCAACCCTTAAATTTGNTTTTCCCCGCAGGAAGTTCCTGTCC-----
      1180      1190      1200      1210

      5090      5100      5110      5120      5130      5140
EMBOSS  CCTACTTCCCGCACTTCGACCTGAGCCACGGCTCTGCCCAGGTTAAGGGCCACGGCAAGA
      :::::
EMBOSS  ---CTTCCC-----
      1220

```

รูป A ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการส่งทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ $\alpha 2$ globin gene ใน Gene Bank number DQ431198 (ต่อ)



GenBank: DQ431198 with α globin normal gene

```

141901 ccaccctccc cctcgccaag tccaccctt ccttctctac cccacatccc ctcacctaca
141961 ttctgcaacc acaggggcct tctctcccct gtcctttccc taccagagc caagtttgtt
142021 tatctgttta caaccagtat ttacctagca agtcttccat cagatagcat ttggagagct
142081 ggggggtgtca cagtgaacca cgacctctag gccagtgga gtagtcagtc cacaactgtt
142141 gagtccatga cttggggcct agccagcacc caccaccca cgcgccacc cacaaccccg
142201 ggtagaggag tctgaatctg gagcgcccc cagcccagcc ccgtgtttt tgcgtcctgg
142261 tgtttgttcc ttcccgtgct ctgtcactca agcacactag tgactatcgc cagagggaaa
142321 gggagctgca ggaagcgagg ctggagagca ggaggggctc tgcgcagaaa ttcttttgag
142381 ttcctatggg ccagggcgctc cgggtgcgcg cattcctctc cgcgccagga ttgggcgaag
142441 cctcccggtc cgcactcgct cgcccggtgtg ttccccgata ccgctggagt cgtatgcgct
142501 ccagcgctg ccagggcggg gcgggggtgc gggctgactt tctccctcgc tagggacgct
142561 ccggcgcccg aaaggaaagg gtggcgctgc gctccggggt gcacgagccg acagcgcccg
142621 accccaacgg gccggccccc ccagcgccgc taccgcccgt ctcggggcg agcggtatgg
142681 gcgggagtg agtgggcggt ggaggggtga gacgtcctgg ccccgcccc gcgtgcaccc
142741 ccaggggagg ccgagcccg cgcggcgccc cgcgcaggcc ccgcccggga ctcccctgcg
142801 gtccaggccg cgccccgggc tccgcgcag ccaatgagcg ccgcccggcc gggcggtgcc
142861 ccgcgcccc aacataaaacc ctggcgcgct cgcggcccg cactcttctg gtccccacag
142921 actcagagag aaccaccatc ggtgctgtct cctgccgaca agaccaacgt caaggccgcc
142981 tggggtaagg tcggcgcgca cgtggcgagg tatggtgcgg aggcctgga gaggtgaggg
143041 tccctccctc gctccgaccc gggtcctcgc ccgcccggga cccacagcc accctcaacc
143101 gtcttgcccc cggacccaaa ccccacccct cactctgctt ctccccgag gatgttctct
143161 tcttcccca ccaccaagac ctacttccc cacttcgacc tgagccacgg ctctgcccag
143221 gttaagggcc acggcaagaa ggtggccgac gcgtgacca acgcccgtgg gcacgtggac
143281 gacatgccca acgcgctgtc cgccctgagc gacctgcacg cgcacaagct tcgggtggac
143341 ccggtcaact tcaagggtgag cggcgggccg ggagcgatct gggtcgaggg gcgagatggc
143401 gccttctctc cagggcagag gatcacgcgg gttgcgggag gtgtagcgca ggcgcgggct
143461 gcgggcctgg gccgcactga cctcttctc tgcacagctc ctaagccact gcctgctggg
143521 gaccctggcc gccacacctc ccgcccaggt caccctgcg gtgcacgctt ccttgacaaa
143581 gttcttggtc ttgttgagca ccgtgctgac ctccaaatac cgttaagctg gagcctcggt
143641 agccgttctc cctgcccgtc gggcctccca acgggcccct ctcctctctc tgcaccggcc
143701 ctctctgttc tttgaataaa gtctgagtg gcggcagcct gtgtgtgctt gggttctctc
143761 tgtcccgga tgtgccaaca atggaggtgt ttacctgtct cagaccaagg acctctctgc
143821 agctgcatgg ggtggggag ggagaactgc agggagtatg ggaggggaag ctgaggtggg
143881 cctgctcaag agaaggtgct gaacctccc ctgtcctgag aggtgccag cctgcaggca
143941 gtggctcaga agctggggag gagagaggca tccagggttc tactcagga gtcccagcat
144001 cgccaccctc ctttgaaatc tccctggttg aaccaggtta acatacgctc tccatcaaaa
144061 caaacgaaa caaacaaaac tagcaaaata ggctgtcccc agtgcaagtg caggtgccag
144121 aacatttctc tcattccac ccttctctgc cagagggtag gtggctggag tgaggtgctt
144181 ggccctactc acacttctct gtgtacgggt accctctgag agcagcccag tcagtgggga
144241 aggaggaagg ggctgggatg ctcacagccg gcagcccaca cctggggaga ctcttcagca
144301 gagcaccttg cggccttact cctgcagctc tctgcagtt tgtaagggtg attcagaact
144361 cactgtgtgc ccagccctga gctcccagct aattgcccc cccagggcct ctgggacctc
144421 ctgggtgttc tgcttctgt gctgccagca acttctggaa acgtccctgt ccccggtgct
144481 gaagtctctg aatccatgct gggaagtgtc acagcccatc tggctctcag ccagcctagg
144541 aacatgagca gcacttccaa cccagtcctc gcccacagc aagcctcccc ctccacactc
144601 acagtactgg attgagcttt ggggaggggt gagaggacct tgtcactgct ttcttctggt
144661 acatggacct ctctgaattg ttggggaggt ccctcccctc tccaccaccc gctcttctct
144721 cgcttcacag cccagagcat tgttatttca gcagaaacac tttaaaaaat aaactaaaat

```

รูป B ยีนขาดหายไปของ $\alpha 2$ globin gene ในผู้ที่ เป็นพาหะแอลฟาเบวธาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป

3.7 กิโลเบส ที่ตำแหน่ง 142,554 ถึง 146,358 คิดเป็นความยาว 3,805 bp

```

144781 cgcacaggca cgggtggctca cgctgtgaat cccagcactt tgggaggccg aggtgggagg
144841 atcacctgag gtcgggagtt tgagaccacc ctgatcaaca tgtagaaacc ccattctatac
144901 taaaaataca aaatcagccg ggcatgggtg gccatgcctg taaacccacc tactccggag
144961 gctgaggcag gagaatcatt ttaaccaagg aggcagaggt tgcaagtgagc taagatcaca
145021 ccattgcact ccagcctgga aaacaacagc gaaactccgc ctcaaaaaaa aaaaagcccc
145081 cacatcttat cttttttttt tccttcaggc tgtgggcaga gtcagaagag ggtggcagac
145141 agggagggga aatgagaaga tccaacgggg gaagcattgc taagctagtc ggagctactt
145201 ctttctctgc ccaaggcagc ttaccctggc ttgctcctgg acaccagggt cagggcctga
145261 gtaagggcct ggggagacag ggcagggagc aggtgaagg gtgctgacct gatgcactcc
145321 tcaaagcaag atcttctgcc agacccccag gaaatgactt atcagtgatt tctcaggctg
145381 ttttctctc agtaccatcc ccccaaaaaa catcactttt catgcacagg gatgcaccca
145441 ctggcactcc tgcacctccc acccttcccc agaagtccac cccttctctc ctaccctgc
145501 aggagctggc cagcctcatc accccaacat ctccccacct ccattctcca accacagggtc
145561 ccttgtctcc tctgtccttt cccctccccg agccaagcct cctccctcct ccactctctc
145621 cacctaatac atatccttaa gtctcacctc ctccaggaag ccctcagact aacctgggtc
145681 cccttgaatg cctcgtccac acctccagac ttctcagggt cctgtgatga ggtctgcacc
145741 tctgtgtgta cttgtgtgat ggttagagga ctgcctacct cccagaggag gttgaatgct
145801 ccagccggtt ccagctattg ctttgtttac ctgtttaacc agtatttacc tagcaagtct
145861 tccatcagat agcatttggg gagctggggg tgtcacagtg aaccacgacc tctaggccag
145921 tgggagagtc agtcacacaa actgtgagtc catgacttgg ggcttagcca gcaccacca
145981 cccacgcgc caccacaaa cccgggttag aggagtctga atctggagcc gcccccagcc
146041 cagccccgtg ctttttgctt cctgggtgtt attccttccc ggtgcctgtc actcaagcac
146101 actagtgact atcgccagag ggaaagggag ctgcaggaag cgaggctgga gagcaggagg
146161 ggctctgcgc agaaattctt ttgagttcct atgggccagg gcgtccgggt gcgcgcatct
146221 ctctccgccc caggattggg cgaagcctcc cggtctgcac tcgctcgccc gtgtgttccc
146281 cgatcccgct ggagtcgatg cgcgtccagc gcgtgccagg ccggggcggtt ggtgcgggct
146341 gactttctcc ctgcgttagg acgctccggc gcccgaaagg aaagggtggc gctgcgtccc
146401 ggggtgcacg agccgacagc gcccgacccc aacgggcccg ccccgccagc gccgtaccgt
146461 ccctgctccc gggcgagcgg gatgggcggg agtggagtgg cgggtggagg gtggagacgt
146521 cctggccccg gcccgcggtg cacccccagg ggagggcgag cccgcgcgcc ggccccgcgc
146581 agggccccgc cgggactccc ctgcgggtcca ggccgcgcgc cgggctccgc gccagccaat
146641 gagcgccgccc cggccgggctg tgcccccgcc cccaagcat aaacctggc gcgctcgcg
146701 cccggcactc ttctgggtccc cacagactca gagagaaccc acctgggtgc tgtctcctgc
146761 cgacaagacc aacgtcaagg ccgctggggg taaggctggc gcgcacgctg gcgagtatgg
146821 tgcgagggcc ctggagaggt gaggtctccc cccctgctcc gacccgggct cctcgcccgc
146881 ccggacccac aggcaccct caaccgtcct ggccccggac ccaaacccca cccctactc
146941 tgcttctccc cgcaggatgt tctgtcctt cccaccacc aagacctact tcccgcactt
147001 cgacctgagc cagggtctgt cccagggttaa gggccacggc aagaagggtg ccgacgcgct
147061 gaccaacgcc gtggcgacg tgagacgacat gcccaacgcg ctgtccgccc tgagcgacct
147121 gcacgcgcac aagcttcggg tggacccggt caacttcaag gtgagcggcg ggccgggagc
147181 gatctgggtc gaggggcgag atgggcgctt cctcgcaggg cagaggatca cgcgggttgc
147241 gggagggtga gcgcaggcgg cggctgcggg cctgggcccct cggccccact gaccctcttc
147301 tctgcacagc tcctaagcca ctgctgtctg gtgacctgg ccgcccacct ccccgccgag
147361 ttcaccctg cgggtgcagc ctccctggac aagttcctgg cttctgtgag caccgtgctg
147421 acctccaaat accgttaagc tggagcctcg gtggccatgc ttcttgcccc ttgggcctcc
147481 cccagcccc tctccccct cctgcacccg taccgccgtg gtctttgaat aaagtctgag

```

รูป B ยีนขาดหายไปของ $\alpha 2$ globin gene ในผู้ที่ป่วยเป็นพาหะแอลฟาเบทาลัสซีเมียชนิดขาดหายไป

3.7 กิโลเบส ที่ตำแหน่ง 142,554 ถึง 146,358 คิดเป็นความยาว 3,805 bp (ต่อ)

ประวัติผู้วิจัยหลัก



คำนำหน้า	☒ นาย ☐ นาง ☐ นางสาว
ตำแหน่งทางวิชาการ	☐ ศ. ☐ รศ. ☒ ผศ. ☐ อื่น
ชื่อผู้วิจัย	ดร.สมพล
นามสกุลผู้วิจัย	แพรพันธ์
ชื่อภาษาอังกฤษ	Somphon
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Phraephan
วัน/เดือน/ปีเกิด	21 พฤษภาคม 2517
ที่อยู่ (บ้าน)	94/38 ริลคอนโดอาคารบี หมู่ 7 ต.หลักหก อ.เมืองปทุมธานี
จังหวัด (บ้าน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (บ้าน)	12000
โทรศัพท์ (บ้าน)	-
แฟกซ์ (บ้าน)	-
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 ต.หลักหก อ.เมืองปทุมธานี
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200-30 ต่อ 1432
แฟกซ์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200-30 ต่อ 1451
อีเมล	somphon.p@rsu.ac.th
ปริญญาตรีสาขา	เทคนิคการแพทย์
ปีที่จบ	2539
สถาบัน	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปริญญาโทสาขา	ชีวเคมี
ปีที่จบ	2552
สถาบัน	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปริญญาโทสาขา	ชีวเคมี
ปีที่จบ	2558
สถาบัน	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประเทศ	ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

- 1) บุญทริกา ทองดอนฟุ่ม, กิตติมา วานิชกุล, อุดุลย์ บุญเฉลิมชัย, **สมพล แพรพันธ์**. (2567). การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจหา ยีน *hemolysin* ของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ก่อโรคในปลานิล. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. In press.
- 2) Makonkawkeyoon L, Sophar B, **Pharephan S**, Makonkawkeyoon S. (2006). Production of a mouse hybridoma secreting monoclonal antibody highly specific to β^E -globin chain for the detection of hemoglobin E in southeast Asian populations. Chiang Mai Med Bull. 45(1):1-10.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

- 1) **Phraephan S**, Watanasatitarpa S, Intorasoot S. (2020). Naked Eye Detection of α^0 Thalassemia --^{SEA} Type using Hydroxynaphthol Blue Loop-mediated Isothermal Amplification. Open Access Maced J Med Sci. Jul 12; 8(E):236-240.
- 2) Suriyaprom K, Sirikulchayanonta C, Tungtrongchitr R, Namjuntra P, **Phraephan S**, Sornwatana T. (2020). The Relationship between Characteristics of Cigarette Smoking and Cytokine/Antioxidant Status in Thai Males. J Med Assoc Thai. 103 (1):38-45.
- 3) **Pharephan S**, Sirivatanapa P, Makonkawkeyoon S, Tuntiwechapikul W, Makonkawkeyoon L. (2016). Prevalence of α -thalassemia genotypes in pregnant women in northern Thailand. Indian J Med Res. 143(3):315-22.

- 4) **Pharephan S**, Intorasoot S, Tuntiwechapikul W, Makonkawkeyoon S, Makonkawkeyoon L. (2015). Cloning and expression of a recombinant single-chain variable fragment antibody specific to hemoglobin Bart's. *Asian Pac J Health Sci.* 2(1):28-35.
- 5) Makonkawkeyoon L, **Phraephan S**, Sirivatanapa P, Tuntiwechapikul W, Makonkawkeyoon S. (2010). Development of an ELISA strip for the detection of α thalassemias. *Haematologica.* 95(2):338-9.
- 6) Makonkawkeyoon L, **Phraephan S**, Tuntiwechapikul W, Makonkawkeyoon S. (2009). Application of monoclonal and polyclonal antibodies to Hb Bart's for the detection of α thalassemias. *The Open Hematology Journal.* 3:11-17.
- 7) Makonkawkeyoon L, **Pharephan S**, Makonkawkeyoon S. (2006). Production of a mouse hybridoma secreting monoclonal antibody highly specific to hemoglobin Bart's (γ 4). *Lab Hematol.* 12(4):193-200.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ (โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนา และสถานที่)

- 1) Pongparit S, Bunchaleamchai A, Supcharoenoon U, Veeramano R, Watanasatitarpa S and **Phraephan S**. (2017). Fecal colonization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. among food-producing animals from farms in Thailand. In: Areerat, Y. editor., *Processing RSU Natural Research Conferences 2017*. 28 April 2017 Rangsit University Pathumthani Thailand. 77–86.
- 2) Somyanonthanakul R, Gatedee J, **Phraephan S**, Suriyaprom K, Phurijaruyangkun S, Muangman S, and Preecha Pangsup. (2017). Design and Implementation of Laboratory Information System: A Case Study at the Medical Technology Clinic, Rangsit University. *RSU International Research Conference.* 224-232.

- 3) Makonkawkeyoon L, **Phraephan S.** Tuntiwechapikul W, Sirivatanapa P, and Makonkawkeyoon S. Development of an ELISA strip for the detection of α -thalassemias (Poster). The 3rd Biochemistry and Molecular Biology conference: April 6-8, 2011. The Empress Convention Center, Chiang Mai, Thailand.
- 4) **Phraephan S.** Sansomchai P, Munde Y, Makonkawkeyoon L. Stimulatory Effects of Plant Extracts on Phagocytosis and Intracellular Killing of Human Neutrophils (Poster). Chiang Mai International Health Promotion Meeting 3rd Experience Nature Balance with Lanna Culture. July 2-3, 2010. Chiang Mai, Thailand.
- 5) Wongchankham W, **Phraephan S.** Kaowinn S, Yamada S, Tuntiwechapikul W, Makonkawkeyoon L. Association between IL-1 Beta Interleukin-receptor Antagonist Gene Polymorphism and the Risk of Gastric Cancer in Northern Thai Patients (Poster). APOCP General Assembly Satellite Meeting. November 6-7, 2006. Chiang Mai, Thailand.
- 6) Makonkawkeyoon L, **Phraephan S.** Yamada S and Makonkawkeyoon S. Risk of Gastric Cancer and Interleukin 1 Polymorphisms in Thai Patients (Poster). The fifth princess Chulabhorn. International Science Congress. Evolving Genetics and Its global Impact. August 16-20, 2004. Bangkok, Thailand.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ (โปรตรอบุหวัข้อประชุม/สัมมนา และสถานที่)

-

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล (โปรตรอบุรางวัลที่ได้รับ)

-

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร (โปรตรอบุวารสารที่ตีพิมพ์)

-

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

ชีวเคมี และอณูชีววิทยา

ประวัติผู้ร่วมวิจัย



คำนำหน้า	☒ นาย ☐ นาง ☐ นางสาว
ตำแหน่งทางวิชาการ	☐ ศ. ☐ รศ. ☒ ผศ. ☐ อื่น
ชื่อผู้วิจัย	อดุลย์
นามสกุลผู้วิจัย	บุญเฉลิมชัย
ชื่อภาษาอังกฤษ	Adun
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Bunchalermchai
วัน/เดือน/ปีเกิด	-
ที่อยู่ (บ้าน)	-
จังหวัด (บ้าน)	-
รหัสไปรษณีย์ (บ้าน)	-
โทรศัพท์ (บ้าน)	-
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 ต.หลักหก อ.เมืองปทุมธานี
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200-30 ต่อ 1433
แฟกซ์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200-30 ต่อ 1451
อีเมล	adun.b@rsu.ac.th
ปริญญาตรีสาขา	เทคนิคการแพทย์
ปีที่จบ	2545
สถาบัน	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ปริญญาโทสาขา	อนุชีววิทยา
ปีที่จบ	2549
สถาบัน	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประเทศ	ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

- 1) บุญทริกา ทองดอนฟุ่ม, กิตติมา วานิชกุล, **อดุลย์ บุญเฉลิมชัย**, สมพล แพรพันธ์. (2567). การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาเอนไซม์ *hemolysin* ของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ก่อโรคในปลานิล. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. In press.
- 2) กรณีศึกษาการตรวจหาปริมาณสารฟอร์มาลินที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลสด จากตลาดสดในจังหวัดที่ห่างไกลจากพื้นที่ชายฝั่งทะเล (วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 2562)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

- 1) Intestinal parasitic infection among school age students in Lakhok subdistrict, Pathumthani province, Thailand (วารสาร Thammasat Medical Journal, 2561)
- 2) Prevalence of blaOXA genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from clinical specimens from Nopparatjathane hospital. (journal of Current Science and Technology, 2021)
- 3) Sediment Accumulation Assessment During Wet and Dry Seasons in Fish Cage Culture Area: A Case Study of The Rangsit Canal 13 In Thailand's Pathum Thani Province. (GEOMATE Journal, 2022)
- 4) In Vitro Antimicrobial Activity of *Nymphaea pubescens* (Pink Water Lily) Leaf Extracts (Plants, 2023)

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ (โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนา)

-

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

จุลชีววิทยา และอนุชีววิทยา

ประวัติผู้ร่วมวิจัย



คำนำหน้า	☐ นาย ☐ นาง ☒ นางสาว
ตำแหน่งทางวิชาการ	☐ ศ. ☐ รศ. ☒ ผศ. ☐ อื่น
ชื่อผู้วิจัย	ดร.สุพัตรา
นามสกุลผู้วิจัย	วัฒนสาธิตอาภา
ชื่อภาษาอังกฤษ	Dr.Suphatra
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Watanasatitarpa
วัน/เดือน/ปีเกิด	8 มีนาคม 2523
ที่อยู่ (บ้าน)	99/45 หมู่บ้านเดอะนอร์ธเทิร์นทาวน์ หมู่ 2 ซ.คลองหลวง 10 ต. คลองหนึ่ง อ. คลองหลวง
จังหวัด (บ้าน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (บ้าน)	12120
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 ต.หลักหก อ.เมืองปทุมธานี
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200-30 ต่อ 1477
แฟกซ์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200-30 ต่อ 1451
อีเมล	suphatra.w@rsu.ac.th
ปริญญาตรีสาขา	เทคนิคการแพทย์
ปีที่จบ	2545
สถาบัน	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปริญญาโทสาขา	ปรสตีวิทยา
ปีที่จบ	2548
สถาบัน	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปริญญาเอกสาขา	ชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล

ปีที่จบ 2556
 สถาบัน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
 ประเทศ ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

- 1) Martviset P, Kitvatanachai S, **Watanasatitarpa S**, Trakulsomboon S, Bunchaleamchai A. (2018). Intestinal parasitic infection among school age students in Lakhok subdistrict, Pathumthani province, Thailand. Thammasat Medical Journal; 18(2):
- 2) Kaulpiboon J, Poomipark N, **Watanasatitarpa S**. (2016). Expression and characterization of amylomaltase gene involved in the large-ring cyclodextrin and isomaltooligosaccharide production. Thammasat International Journal of Science and Technology; 21(1): 18-28.
- 3) Kitvatanachai S, Boonslip S, **Watanasatitarpa S**. (2008). Intestinal parasitic infections in Srimum suburban area of Nakhon Ratchasima Province, Thailand. Trop Biomed; 25(3):237-42.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ (โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์)

- 1) Phraephan S, **Watanasatitarpa S**, Intorasoot S. (2020). Naked eye detection of α^0 thalassaemia --^{SEA} type using hydroxyl naphthol blue-loop mediated isothermal amplification. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences; 8 (E): 236-240. DOI: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2020.3844>.
- 2) Kaulpiboon J, Rudeekulthamrong P, **Watanasatitarpa S**, Ito K, Pongsawasdi P. (2015). Synthesis of long-chain isomaltooligosaccharides from tapioca starch and an in vitro investigation of their prebiotic properties. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 120: 127-135.

- 3) **Watanasatitarpa S**, Rudeekulthamrong P, Krusong K, Srisimararat W, Zimmermann W, Pongsawasdi P, Kaulpiboon J. (2014). Molecular mutagenesis at Tyr-101 of the amylomaltase transcribed from a gene isolated from soil DNA. *Appl Biochem Microbiol*; 50(3):273-82.
- 4) Laha T, Loukas A, **Watanasatitarpa S**, Somprakhon J, Kewgrai N, Sithithaworn P, Kaewkes S, Mitreva M, Brindley P.J. (2007). The bandit, a new DNA transposon from a hookworm-possible horizontal genetic transfer between host and parasite. *PLoS Negl Trop Dis*; 1(1):e35.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ (โปสเตอร์หัวข้อประชุม/สัมมนา และสถานที่)

- 1) **Watanasatitarpa S.** and Sunantaraporn S. (2017). Development of dye wet mount preparation for diagnosis of parasites in feces. *Proceedings of the 5th Academic Science and Technology Conference: ASTC.*
- 2) Kengkarn S, Lektrakul W, and **Watanasatitarpa S.** (2017). Prevalence of thalassemia and hemoglobinopathies in tambon Huaihaeng, Kaengkhroi district, Saraburi province. *Proceedings of the 5th Academic Science and Technology Conference: ASTC.*
- 3) **Watanasatitarpa S.** (2018). α -Amylase and α -Glucosidase inhibitory activity of crude extract from petal of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Proceedings of the 6th Academic Science and Technology Conference: ASTC.*
- 4) **Watanasatitarpa S.** (2019). α -Amylase and α -Glucosidase inhibitory activity of crude extract from *Osmanthus fragrans* flower. *Proceedings of the 7th Academic Science and Technology Conference: ASTC.*

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

โลหิตวิทยา