โครงการวิจัยเรื่อง การตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายไปของยีน ด้วยเทคนิค 4- deletion multiplex PCR

(Diagnosis of deletion type of α-thalassemia with 4-deletion multiplex PCR)

ภายใต้แผนงานวิจัย การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในจังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

แอลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบมากในประเทศไทย ชนิดที่มีความรุนแรงคือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเกิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (SEA) และ Thai deletion นอกจากนี้ยังมีแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ซึ่งความรุนแรงของโรคไม่มากเท่าชนิดแรกเกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด-3.7 kb และ -4.2 kb ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคแอลฟาธาลัสซีเมียของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรด้วยเทคนิค gap PCR นั้นเป็นการตรวจเฉพาะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเกิดจากการขาดหายไปของยีนชนิด SEA และ THAI deletion เท่านั้น หากผู้ที่มารับการตรวจมียีนของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดอื่นอาจนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยที่ผิดพลาดได้ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคที่สามารถตรวจหายีนแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายของยีนทั้ง 4 ชนิดในการตรวจเพียงครั้งเดียว (4-deletion multiplex PCR) ได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α-thal 1) ชนิด SEA, THAI deletion แอฟาธาลัสซีเมีย (α-thal 2) ชนิด -3.7 kb และ -4.2 kb deletion ซึ่งครอบคลุมชนิดของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินที่พบได้ในประชากรจังหวัดพิษณุโลก โดยได้นำมาตรวจวินิจฉัยผู้ที่มารับการตรวจโรคธาลัสซีเมียจำนวน 10 ราย พบว่า เทคนิค 4-deletion multiplex PCR ให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องเหมือนกับการใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคแบบเดิม แต่สามารถลดค่าใช้จ่าย และระยะเวลาในการตรวจหาชนิดของโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายของยีนได้ โดยคณะผู้วิจัยมีแผนที่จะนำเทคนิคดังกล่าวมาตรวจวินิจฉัยในประชากรพิษณุโลกในจำนวนอีก 100 ราย เพื่อประเมินและทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค รวมทั้งเก็บข้อมูลความชุกของชนิดแอลฟาธาลัสซีเมียในพื้นที่ดังกล่าวเพื่อใช้ในการวางแผนการควบคุมป้องกันโรคแอลฟาธาลัสซีเมียในจังหวัดพิษณุโลกต่อไป

คำสำคัญ: การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด โรคแอลฟาธาลัสซีเมีย

Abstract

α-Thalassemia is the common genetic disease in Thailand. The cause of α-thalassemia is the deletion of α-globin gene. Southeast Asian (SEA) and THAI deletion types caused the most severe α-thalassemia 1 and deletion sizes 3.7 kb and 4.2 kb caused α-thalassemia 2. For α-thalassemia diagnosis at Naresuan University Hospital, gap PCR technique was used to detect only α-thalassemia 1, SEA and THAI deletion. This protocol did not cover α-thalassemia 2 that might cause misdiagnosis. We developed the technique to detect 4 α -globin gene deletions (α-thalassemia 1: SEA, THAI types and α-thalassemia 2: -3.7 kb, -4.2 kb) found in Phitsaulok population so called 4-deletion multiplex PCR. We tested this technique in known 10 samples from Naresuan University and found that it concordant to the conventional technique. This technique is accurate, efficient, less time-consuming and save the cost in α-thalassemia diagnosis. We planned to tested and evaluated deletions types in 100 Phitsanulok samples. Moreover, these data could be valuable for prevention plan and control of α-thalassemia disease in Phitsanulok province.

Keywords:, α-thalassemia diagnosis, 4-deletion multiplex PCR

บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบมากในประเทศไทย เกิดจากการสังเคราะห์สายโกลบินที่ผิดปกติโดยยีนแอลฟาโกลบินและยีนบีตาโกลบินทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โกลบิน หากเกิดความผิดปกติบนยีนแอลฟาโกลบิน เรียกว่า แอลฟาธาลัสซีเมีย ซึ่งมี 2 ชนิดคือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α-thal 1) และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α-thal 2) เกิดจากการขาดหายไปของแอลฟาโกลบินยีนชนิด Southeast Asian (SEA) และ THAI deletions

แอลฟาธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบมากในประเทศไทย ชนิดที่มีความรุนแรงคือแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเกิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (SEA) และ THAI deletions นอกจากนี้ยังมีแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ซึ่งความรุนแรงของโรคไม่มากเท่าชนิดแรก เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด -3.7 kb และ -4.2 kb ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคแอลฟาธาลัสซีเมียของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรด้วยเทคนิค gap PCR นั้นเป็นการตรวจเฉพาะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ซึ่งเกิดจากการขาดหายไปของยีนชนิด SEA และ THAI deletion เท่านั้น หากผู้ที่มารับการตรวจมียีนของแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดอื่นอาจนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยที่ผิดพลาดได้ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคที่สามารถตรวจหายีนแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายของยีนทั้ง 4 ชนิดในการตรวจเพียงครั้งเดียว (4-deletion multiplex PCR) ได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α-thal 1) ชนิด SEA, THAI deletion แอฟาธาลัสซีเมีย 2 (α-thal 2) ชนิด -3.7 kb และ -4.2 kb deletion ซึ่งครอบคลุมชนิดของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินที่พบได้ในประชากรไทย โดยได้นำมาตรวจวินิจฉัยผู้ที่มารับการตรวจโรคธาลัสซีเมียจำนวน 10 ราย พบว่า เทคนิค 4-deletion multiplex PCR ให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องเหมือนกับการใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคแบบเดิม แต่สามารถลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการตรวจหาชนิดของโรคแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีการขาดหายของยีนได้ จึงสามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และ 2 ที่พบมากในประชากรในจังหวัดพิษณุโลก

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การพัฒนาเทคนิค 4-deletion multiplex PCR เริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของ deletion ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α-thal 1) ชนิด SEA, THAI deletions และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α-thal 2) ชนิด -3.7 kb, -4.2 kb deletions ด้วยดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของ deletion (positive control) จากโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยมหิดล และประเมินประสิทธิภาพโดยการนำเทคนิคนี้มาตรวจวินิจฉัยในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของ deletion จำนวน 10 รายจากหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยนเรศวร

1. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดที่ได้จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร มาสกัดดีเอ็นเอด้วย Chelex® method โดยเติม lysis buffer 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างเลือด 30 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งแล้วดูดสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย 5% Chelex® ให้ท่วมตะกอน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เพื่อใช้หาสภาวะที่เหมาะสมและการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคนี้

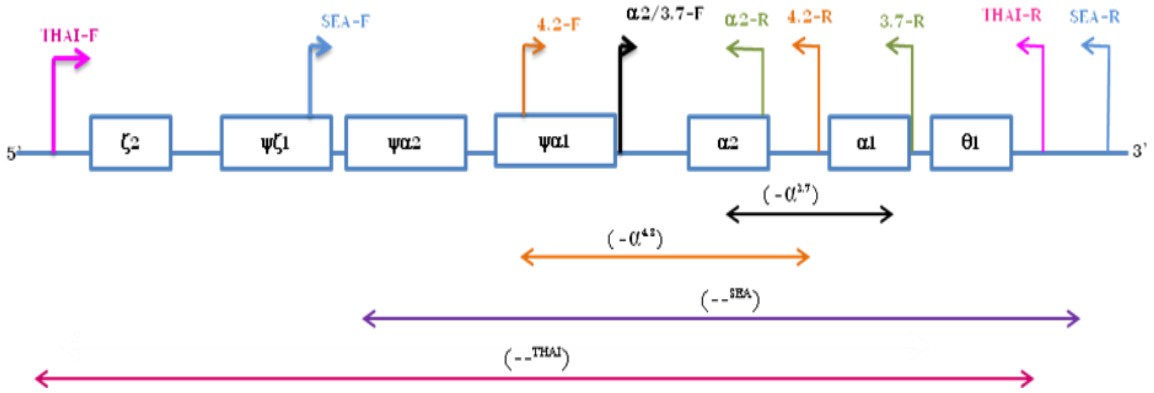
2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของ 4-deletion multiplex PCR

เตรียมสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการทำ 4-deletion multiplex PCR ดังนี้ 200 μM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.25 U *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN, Germany), Q-solution, 200-500 μg DNA และ α-thalassemia primers สำหรับการตรวจ deletion ทั้ง 4 ชนิดจำนวน 9 เส้น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นที่ใช้ดังแสดงในตารางที่ 1 รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งที่ไพรเมอร์ทั้ง 9 เส้นวางบริเวณยีนแอลฟาโกลบิน จากนั้นนำไปตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค gap PCR โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อทำให้ *Taq* DNA Polymerase อยู่ในสภาพพร้อมทำหน้าที่ จากนั้นจึงเข้าสู่วงรอบของการทำ gap PCR โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 15 วินาที จำนวน 35 รอบ และเพิ่ม extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำมาตรวจวินิจฉัยด้วย 1.5 % อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ที่ 120 โวลท์ เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 9 เส้น ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียทั้ง 4 ชนิด (ปรับปรุงจาก Tan *et al*., 2001)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ตำแหน่ง	ความเข้มข้น
α2/3.7	CCC CTC GCC AAG TCC ACC C	HUMHBA4:5676→ 5694	5 pmol
3.7-R	AAA GCA CTC TAG GGT CCA GCG	HUMHBA4:11514→ 11494	5 pmol
α2-R	AGA CCA GGA AGG GCC GGT G	HUMHBA4:7475→ 7457	5 pmol
4.2-F	GGT TTA CCC ATG TGG TGC CTC	HUMHBA4:3064→ 3084	12.5 pmol
4.2-R	CCC GTT GGA TCT TCT CAT CAT TTC CC	HUMHBA4:8942→ 8920	12.5 pmol
SEA-F	CGA TCT GGG CTC TGT GTT CTC	HSGG1:26120→26140	5 pmol
SEA-R	AGC CCA CGT TGT GTT CAT GGC	HSCOS12:3817→3797	5 pmol
THAI-F	GAC CAT TCC TCA GCG TGG GTG	HSGG1:9592→9612	7.5 pmol
THAI-R	CAA GTG GGC TGA GCC CTT GAG	HSCOS12:1241→1221	7.5 pmol



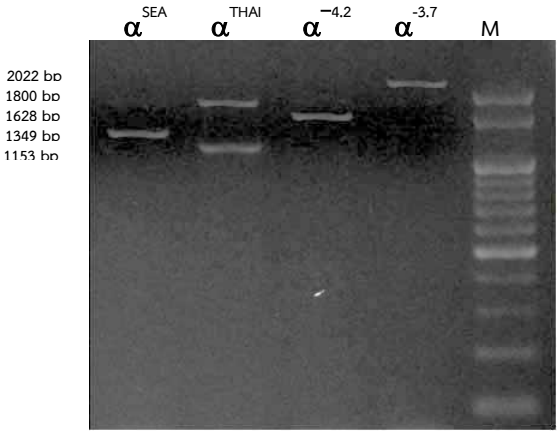
รูปที่ 1 แผนผังของยีนแอลฟาโกลบินและตำแหน่งของไพรเมอร์ แต่ละชนิดที่สามารถจับกับยีนแอลฟาโกลบินในบริเวณที่แตกต่างกัน เครื่องหมาย (↱ และ ↰) แสดงตำแหน่งที่ไพรเมอร์แต่ละชนิดจับกับยีนแอลฟาโกลบิน เครื่องหมาย (↔) แสดงบริเวณที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในแอลฟาธาลัสซีเมียทั้ง 4 ชนิด

3. การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค 4-deletion multiplex PCR

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจึงทดสอบหาความแม่นยำของเทคนิคนี้ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมียแล้วจำนวน 10 ตัวอย่าง และประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคนี้ โดยเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยกับเทคนิค gap PCR ของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร

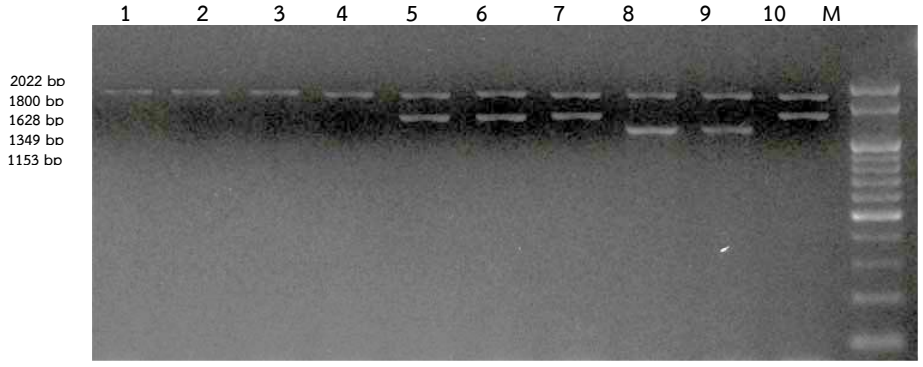
ผลการศึกษา

การตรวจวินิจฉัยหาชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR สามารถแปลผลการตรวจวินิจฉัยได้ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียทั้ง 4 ชนิด (4-deletion α-thalassemia) **แถวที่ 1** เป็นผลของผู้ที่เป็นโฮโมซัยกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion (α^{SEA}) ให้ดีเอ็นเอขนาด 1349 คู่เบส **แถวที่ 2** เป็นผลของผู้ที่เป็นเฮทเทอโรซัยกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด THAI deletion (α^{THAI}) มีดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือ 1800 คู่เบสซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่เป็นปกติ และ 1153 คู่เบสสำหรับ THAI deletion **แถวที่ 3** เป็นผลของผู้ที่เป็นโฮโมซัยกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิดที่มีการขาดหายไปของแอลฟายีนขนาด 4.2 กิโลเบส ($\alpha^{-4.2}$) ให้ดีเอ็นเอขนาด 1628 คู่เบส **แถวที่ 4** เป็นผลของผู้ที่เป็นโฮโมซัยกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิดที่มีการขาดหายไปของแอลฟายีนขนาด 3.7 กิโลเบส ($\alpha^{-3.7}$) ให้ดีเอ็นเอขนาด 2022 คู่เบส ส่วน M คือ 1 kb DNA ladder (Vivantis)

จากการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียในผู้ที่มารับการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมีย ที่หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรจำนวน 10 ราย ด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR พบว่าให้ผลการตรวจที่ตรงกัน คือพบผู้ที่เป็นเฮทเทอโรซัยกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion (α^{SEA}) จำนวน 4 ราย (40%) เฮทเทอโรซัยกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด THAI deletion (α^{THAI}) จำนวน 2 ราย (20%) และ เป็นผู้ที่ไม่มียีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 จำนวน 4 ราย (40%) ผลการตรวจด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR โดยผู้ที่มารับการตรวจหมายเลข 1-4 ให้ผลการตรวจเป็นปกติ ไม่มียีนแอลฟาธาลัสซีเมีย ให้ดีเอ็นเอขนาด 1800 คู่เบส หมายเลขที่ 5-7 และ 10 ให้ผลการตรวจเป็นเฮทเทอโรซัยกัสแอลฟาธาลัสซีมเย 1 ชนิด SEA deletion (α^{SEA}) ซึ่งให้ดีเอ็นเอขนาด 1800 คู่เบสและ 1349 คู่เบส ส่วนหมายเลขที่ 8และ 9 พบว่าเป็นเฮทเทอโรซัยกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด THAI deletion (α^{THAI}) ซึ่งให้ดีเอ็นเอขนาด 1800 คู่เบสและ 1153 คู่เบส ส่วน M คือ 1 kb DNA Ladder (Vivantis)

อภิปรายผลการศึกษา

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค 4-deletion multiplex PCR นี้พบว่าจำเป็นต้องใส่สาร adjuvant เช่น DMSO, betaine ซึ่งในที่นี้คือ Q-solution (QIAGEN, Germany) ร่วมด้วยเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยแอลฟาโกลบินยีนเป็น GC-rich จึงต้องใช้ adjuvant ในสภาวะดังกล่าว

นอกจากนี้ในการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียในผู้ที่มารับการตรวจที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรพบว่าให้ผลตรงกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี gap PCR ของหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร พบว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ชนิด SEA deletion เป็นชนิดที่พบมากที่สุด (0.4%) รองลงมาคือ THAI deletion (0.2%) และไม่พบแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ชนิด 3.7 kb และ 4.2 kb deletions ในตัวอย่างจำนวน 10 ราย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wong *et al*., 2004 ที่จะพบเฉพาะแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ในประชากรพิษณุโลก แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจวินิจฉัยมีจำนวนน้อยเกินไป จึงต้องดำเนินการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR เพิ่มเติมจึงจะสามารถสรุปผลได้สมบูรณ์ อย่างไรก็ดีการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ตรวจในเขตพื้นที่อื่นๆ ในประเทศไทยได้ เพราะสามารถตรวจได้ทั้งแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 เนื่องจากการอพยพย้ายถิ่นของประชากรไทยและชาวต่างชาติในประเทศไทย ทำให้การตรวจวินิจฉัยที่ครอบคลุมแอลฟาธาลัสซีเมียทั้ง 2 ชนิด จะสามารถควบคุมและป้องกันการเกิดโรคของประชากรในจังหวัดพิษณุโลกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการวิจัย

เทคนิคการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค 4-deletion multiplex PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากเป็นการตรวจที่ครอบคลุมการตรวจวินิจฉัยแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และ 2 ซึ่งเป็นชนิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน ทั้ง 4 ชนิดคือ แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α-thal 1) ชนิด SEA และ THAI deletions แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α-thal 2) ชนิดที่มีการขาดหายของยีนแอลฟาขนาด -3.7 kb และ -4.2 kb ที่พบมากในประชากรไทย สามารถนำไปใช้ได้ในทุกพื้นที่ของประเทศไทยและประเทศข้างเคียงบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณ ดร.หม่อมหลวงเสาวรส สวัสดิวัฒน์ หัวหน้าโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อไพร์เมอร์และดีเอ็นเอที่ใช้ในการพัฒนาเทคนิคและทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ขอขอบคุณหน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคนี้

เอกสารอ้างอิง

Bhat, V., Dewan, K.K., Krishnaswamy, P.R. (2010). The diagnosis of a-thalassemia: A case of hemoglobin H $-\alpha^{3.7}$ deletion. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*,24,435-440.

Chong, S.S., Boekm, C.D., Cutting, G. R., Higgs, D.R. (2000). Simplified multiplex-PCR diagnosis of common Southeast Asian deletional determinants of α-thalassemia. *Clinical Chemistry*,46,1692-1695.

Chong, S.S., Boehm, C.D., Higgs, D.R., Cutting, G.R. (2000). Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood*,95,360-62.

Eng, B., Patterson, M., Borys, S., Chui, D.H.K., Waye, J.S. (2000). PCR-based diagnosis of the Filipino ($--^{Fil}$) and thai ($--^{THAI}$) α-thalassemia-1 deletions. *American Journal of Hematology*,63,54-56.

Ko, T.M., Tseng, L.H., Kao, C.H., Lin, Y.W., Hwa, H.L., Hsu, P.M., et al. (1998). Molecular characterization and PCR diagnosis of Thailand deletion of α-globin gene cluster. *American Journal of Hematology*,57,124-130.

Liu, Y.T., Old, J.M., Miles, K., Fischer, C.A., Weatherall, D.J., Clegg, J.B. (2000). Rapid detection of alpha thalassemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reaction. *British Journal of Haematol*ogy,108,295-99.

Wong, P., Thanomrat, P., Srithipayawan, S., Jermnim, N., Niyomthom, S., Nimnuch, N., et al. (2006). Risk of a couple having a child with severe thalassemia syndrome; prevalence in lower northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medical Public Health*,37,1-4.

Pornprasert, S., Phusua, A., Suanta, S., Sawtung, R., Sanguansermsri, T. (2008). Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR green1 and high resolution melting analysis. *European Journal of Hematology*,80,510-514.

Prathomtanapong, P., Pornprasert, S., Phusua, A., Suanta, S., Saetung, R, Sanguansermsri, T. (2008) Detection and identification of β-thalassemia 3.5 kb deletion by SYBR green 1 and high resolution melting analysis. *European Journal of Hematology*,82,159-160.

Pravatmuang, P., Tiloklurs, M., Suannum, M., Chaipat, C. (1995). Phitsanulok population: the highest incidence of hemoglobin E in the northern provinces of Thailand and PND counseling. *Southest Asian Journal of Tropical Medical Public Health*, 26 suppl 1,266-70.

Shaji, R.V., Eunice, S.E., baidya, S., Srivastava, A., Chandy, M. (2003). Determination of the breakpoint and molecular diagnosis of a common a-thalassemia-1 deletion in the Indian population. *British Journal of Hematology*,123,942-947.

Tan, A.C., Quah, T.C., Low, P.S., Chong, S.C. (2000). A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for α-thalassemia. *Blood*,98,250-251.

Wong, P., Thanomrat, P., Srithipayawan, S., Taytiwat, P., Jermnim, N., Niyomthom, S., et al. (2004). Prevalence of thalassemia trait from screening program in pregnant women of Phitsanulok. *Thai Journal Hematology Transfusion Medicine*,14,181-86.