144

เรื่อง ท....๑๓๙..................../๒๕๔

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การขาดหายไปของยีนไมโตคอนเดรียในผู้ป่วยชาวไทยที่มีความผิดปกติทางกล้ามเนื้อและสมอง

(ภาษาอังกฤษ): Deletion Mutation in Mitochondrial Genome from Thai Encephalomyopathic Patients

ชื่อผู้วิจัย : นางสาวอริสา อิ่มสำราญ

ชื่อสถาบันระดับอุดมศึกษา: มหาวิทยาลัยมหิดล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2539 จำนวน 40,000 (สี่หมื่นบาทถ้วน) บาท ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี 6 เดือน ตั้งแต่ เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2539 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2541

บทคัดย่อ

ในปัจุบันนี้ ความสำคัญของยีนไมโตคอนเดรียในฐานะที่ทำให้เกิดโรคในคนได้นั้น เริ่มเป็นที่รู้จักและกล่าวถึงมากขึ้น ความผิดปกติของยีนไมโตคอนเดรียที่พบได้บ่อย 2 ชนิด คือ ความผิดปกติจากการขาดหายไปของชิ้นส่วนของยีน และจากการแทนที่ของเบสเพียงตำแหน่งเดียว การทำวิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาเพื่อหาความผิดปกติของยีนไมโตคอนเดรียในผู้ป่วยชาวไทย 10 ราย ที่มีอาการทางกล้ามเนื้อและสมอง และจากลักษณะอาการของผู้ป่วยเชื่อว่า น่าจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของยีนไมโตคอนเดรีย โดยได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเซลล์กล้ามเนื้อ และ/หรือ เม็ดเลือดขาว แล้วนำไปหาขนาดของยีนไมโตคอนเดรียโดยวิธีของเซาเธอร์น ซึ่งพบการขาดหายไปของยีนไมโตคอนเดรียขนาด 3.6 กิโลเบส ในตัวอย่างกล้ามเนื้อของผู้ป่วย 1 ราย ในการวิเคราะห์หาตำแหน่งที่ขาดหายไปของยีนไมโตคอนเดรียอย่างหยาบๆ นั้น ทำได้โดยการนำดีเอ็นเอของผู้ป่วยมาเพิ่มจำนวนด้วยชุดไพร์เมอร์ 5 ชุด ที่จับจำเพาะกับยีนไมโตคอนเดรียในบริเวณต่างๆกันและครอบคลุมยีนไมโตคอนเดรียเกือบทั้งหมด และสามารถยืนยันการวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนที่ขาดหายไปดังกล่าว ด้วยการเพิ่มจำนวนยีนโดยการเปลี่ยนตำแหน่งของชุดไพร์เมอร์ที่จับจำเพาะกับยีนไมโตคอนเดรีย จากนั้น นำดีเอ็นเอที่มีส่วนของยีนไมโตคอนเดรียที่ขาดหายไปที่เพิ่มจำนวนได้ มาหาตำแหน่งที่แน่นอนโดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี และการหาลำดับเบสบนดีเอ็นเอ ซึ่งพบการขาดหายไปของยีนไมโตคอนเดรียที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 10208 ถึง 13765 หรือที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 10204 ถึง 13761 ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนหน่วยย่อยที่ 3, 4แอล, 4 และ 5 ของเอนไซม์คอมเพลกซ์ที่ 1 ในกระบวนการหายใจ รวม

145

ไปถึงยีนของทรานสเฟอร์อาร์เอ็นเอสำหรับกรดอะมิโนฮิสติดีน, ลิวซีน และอาร์จินีน และพบตำแหน่งของเบส 4 ตัว คือ ทีซีซีซี ที่ซ้ำกันที่ตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของยีนไมโตคอนเดรีย และยังตรวจพบการขาดหายไปของยีนไมโตคอนเดรียนี้ได้อีกในผู้ป่วยจำนวน 3 รายที่มีอาการทางกล้ามเนื้อและสมองที่ไม่ทราบสาเหตุด้วยวิธีพีซีอาร์ ในผู้ป่วยแต่ละคนนั้น การขาดหายไปของยีนไมโตคอนเดรียอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่แตกต่างไปจากตำแหน่งของยีนไมโตคอนเดรียที่ขาดหายไปในรายอื่นๆที่ได้เคยรายงานมาแล้ว การกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยเหล่านี้ตรวจพบได้เฉพาะในตัวอย่างกล้ามเนื้อ แต่ไม่พบในตัวอย่างเม็ดเลือดขาว สำหรับผู้ป่วยที่เหลืออีก 6 รายนั้น ไม่สามารถตรวจพบการขาดหายไปของยีนไมโตคอนเดรีย ไม่ว่าจะเป็นด้วยวิธีของเซาเธอร์นหรือเทคนิคพีซีอาร์

Abstract

The importance of mitochondrial DNA as an underlying lesion of human disorders has become apparent in recent years. Two major types of mtDNA mutation have been observed, large multigene deletion and single base substitution. In this thesis, we studied the molecular lesion of mtDNA in 10 Thai patients with encephalomyopathies. The DNA from skeletal muscle and blood leukocytes were extracted using appropriate methods. The Southern blot hybridization analysis was performed for determination of the size of mtDNA. The deleted region of mtDNA was mapped by amplification with 5 primer pairs covering almost the total mitochondrial genome and confirmed by PCR primer shift analysis. The exact position of the deletion was determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis followed by DNA sequence analysis. One patient was found to have 3.6 kb deletion in mtDNA by Southern blot analysis and PCR analysis. The deleted position was localized to nt10208/13765 or nt10204/13761 spanning the coding area of subunit 3 (ND3), 4L (ND4L), 4 (ND4) and 5 (ND5) of respiratory chain enzyme complex I and also the transfer RNA genes for histidine, serine, leucine and arginine. The sequence flanking the deletion was 4 bp repeat of TCCC. This mtDNA deletion was also found by PCR analysis in 3 other patients with encephalomyopathies. All of the patients who have gene 3558 bp deletion seem to have a unique deleted position in their mtDNA which is different from those reported in the literature but the same among themselves. The mutation of these patients could only be detected in muscle but not in blood samples. This deletion in mtDNA was not found in the other 6 patients by either Southern blot analysis or PCR analysis.