

การวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบกเกอร์ในผู้ป่วยไทยโดย
พอลิเมอเรสเชนรี แอ็กซัน

นางสาวรุจิณี ปดิฐพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาพฤกษศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-584-547-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSIS OF DUCHENNE/BECKER
MUSCULAR DYSTROPHY IN THAI PATIENTS

Miss. Rujinee Paditaporn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Botany

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-584-547-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบกเกอร์ในผู้ป่วยไทยโดย
พอลิเมอเรสเชนรีแอคชัน

โดย นางสาวรุจิณี ปดิฐพร

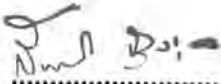
สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ภาควิชา พฤษศาสตร์

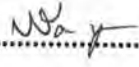
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์พรณี ชินวัักษ์


อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม พันโทนายแพทย์มัทธนา กมลศิลป์

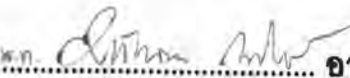
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้มนัวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

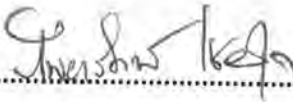

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ อุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญหลง)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์พรณี ชินวัักษ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม
(พันโทนายแพทย์มัทธนา กมลศิลป์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กันยารัตน์ ไชยสุต)

##C425496 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: MUSCULAR DYSTROPHY / DUCHENNE/BECKER MUSCULAR DYSTROPHY/DYSTROPHIN/
PCR. RUJINEE PADITAPORN : POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSIS
OF DUCHENNE/BECKER MUSCULAR DYSTROPHY IN THAI CHILDREN PATIENTS.
THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.PANNEE CHINORUK AND COL.MAHATTANA
KAMOLSILP, 99 pp. ISBN 974-584-547-7

We studied 27 Thai muscular dystrophy patients from Pramongkutkiao Hospital, Siriraj Hospital and from Nongkai, Burirum, Chainart provinces during 1992-1994. It was found that 16 Duchenne/Becker muscular dystrophy male patients which this disease is an X-linked recessive inheritance. It is caused by abnormal dystrophin gene. Total 16 cases, we found 8 patients with partial intragenic deletion. Four patients have gene deletion around the exon 49 (exon 43-52), 2 patients involve region at the 5' terminus (Pm, exon 3, 6, 13) and 2 patients who are brothers have deletion in both regions.


We detected gene deletion with 2 multiplex PCR by 9 exons plus the muscle promoter of the dystrophin gene. These 2 reactions involve at the hot spot regions (around 5' terminus and exon 45-53). We amplified normal male DNA as positive control and water as negative control with each set of reactions to ensure that all primer were active and had not contamination.

And we found 4 limb-girdle muscular dystrophy patients that were inherited by autosomal recessive. 7 patients were Emery-Dreifuss muscular dystrophy that were inherited by the other locus of dystrophin gene on X-chromosome.

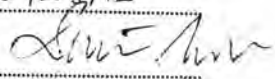
ภาควิชา..... พญกษศาสตร์.....

สาขาวิชา..... พันธุศาสตร์.....

ปีการศึกษา..... 2537.....

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... พญกษ. ชินอรุณ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... พ.น. 

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

รุจิณี ปศิษฐ : การวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อเสื่อมดูเชน/เบคเกอร์ในผู้ป่วยไทยโดย
พอลิเมอร์เชนรีแอคชัน (POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSIS OF
DUCHENNE/BECKER MUSCULAR DYSTROPHY IN THAI PATIENTS) อ.ที่ปรึกษา :
รศ.พรณี ชีโนรักษ์ และ อ.ที่ปรึกษาร่วม : พันโทนายแพทย์ มัทธนา กมลศิลป์, 99 หน้า
ISBN 974-584-547-7

จากการศึกษาผู้ป่วยไทยด้วยโรคกล้ามเนื้อเสื่อมจากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า โรงพยาบาล
ศิริราช และนอกโรงพยาบาล ได้แก่ จังหวัดหนองคาย บุรีรัมย์ ชัยนาท จำนวน 27 ราย ในช่วงปี พ.ศ.
2535-2537 พบผู้ป่วยเด็กชายไทยจำนวน 16 ราย เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิดดูเชน/เบคเกอร์ ซึ่งโรค
นี้มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์ (X-linked recessive inheritance) เรียกยีนนี้ว่า
ยีนดิสโทรฟิน ในผู้ป่วย 16 รายนี้ พบ 8 ราย มีการขาดหายไปของยีนดิสโทรฟิน ซึ่งผู้ป่วย 4 ราย มี
การขาดหายไปของยีนบริเวณส่วนกลางรอบเอกซอนที่ 49 (43-52) ผู้ป่วย 2 ราย มีการขาดหายไปของ
ยีนบริเวณส่วนต้น (Pm, exon 3, 6, 13) และผู้ป่วยอีก 2 ราย มีการขาดหายไปของยีนทั้ง 2 บริเวณ
ซึ่งทั้ง 2 ราย นี้เป็นพี่น้องกัน

การศึกษาการขาดหายไปของยีนดิสโทรฟินใช้เทคนิคพอลิเมอร์เชนรีแอคชัน ชนิดมัลติเพลกซ์
(Multiplex polymerase chain reaction: PCR) โดยการเพิ่มปริมาณยีนดิสโทรฟินของผู้ป่วย ที่
บริเวณที่พบการขาดหายไปของยีนได้บ่อย (hot spot region) คือ บริเวณ 5' terminus และบริเวณ
เอกซอน 45-52 ด้วย primer 10 คู่ การทดลองนี้ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ปฏิกิริยา และมีการตรวจสอบ
ความถูกต้องของปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มปริมาณยีนของชายปกติเป็น positive control ซึ่งจะต้องมีการพบ
ยีนที่เพิ่มทั้ง 10 ตำแหน่ง และเพิ่มปริมาณยีนในน้ำเปล่าเป็น negative control ซึ่งจะต้องไม่มี
ปฏิกิริยาใดเกิดขึ้น

นอกจากนี้ ยังพบผู้ป่วยอีก 4 ราย เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด ลิมบ์-เกอร์เดิล (Limb -
girdle muscular dystrophy) ซึ่งมีการถ่ายทอดโดยยีนด้อยบนออโตโซม (autosomal recessive
inheritance) และอีก 7 ราย เป็นโรคกล้ามเนื้อเสื่อมชนิด เอ็มเมอร์-ดริฟฟัสส์ (Emery-Dreifuss
muscular dystrophy) ซึ่งมีการถ่ายทอดโดยยีนด้อยบนโครโมโซมเอ็กซ์ แต่อยู่คนละตำแหน่งกับยีน
ดิสโทรฟิน

ภาควิชา..... พญักษศาสตร์.....

สาขาวิชา..... พันธุศาสตร์.....

ปีการศึกษา..... 2537.....

ลายมือชื่อนิติ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีรายชื่อดังต่อไปนี้

รองศาสตราจารย์พรณี ชีโนรักษ์ และพันโทนายแพทย์มหัทธนา กมลศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด

รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญหลง และรองศาสตราจารย์ ดร.กันยารัตน์ ไชยสุด ที่ได้ให้คำแนะนำแก้ไขข้อบกพร่อง จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ พันเอกอดิศักดิ์ หนูหน่าย และ ร้อยโทหญิงชไมพร สุวรรณะโสภณ ที่ปรึกษาห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ความรู้ และช่วยแก้ไขปัญหาในห้องปฏิบัติการ PCR และให้กำลังใจด้วยดี

ขอขอบคุณโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า, โรงพยาบาลศิริราช และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณพยาบาล โรงพยาบาลเจริญกรุงประชารักษ์ และผู้ป่วยทุกราย และท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่ชาย และคุณป้าทั้งสอง ที่ให้กำลังใจ และกำลังทรัพย์เสมอมา



สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฅ
คำอธิบายคำย่อ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. บทตรวจสอบเอกสาร.....	4
3. วัสดุอุปกรณ์.....	28
4. วิธีดำเนินการศึกษา.....	39
5. ผลการศึกษา.....	47
6. สรุป และอภิปรายผลการศึกษา.....	79
เอกสารอ้างอิง.....	85
ภาคผนวก.....	91
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	99

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงอาการทางคลินิกเปรียบเทียบโรค DMD กับ BMD.....	9
2 แสดงลำดับ primer 10 คู่ ในการเพิ่มปริมาณยีนดิสโทรฟิน.....	32
3 ข้อมูลทางคลินิกและผลการตรวจการขาดหายไปของยีนดิสโทรฟิน.....	68

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงตำแหน่งของยีนดิสโทรฟินบนโครโมโซมเอ็กซ์.....	6
2 แสดงการติดสีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของแอนติบอดีต่อโปรตีนดิสโทรฟิน.....	16
3 ลำดับเบสของยีนดิสโทรฟินบางส่วน.....	19
4 แสดงหลักการของพอลิเมอเรสเซนรี แอ๊กชัน.....	26
5 แสดงอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเลือด.....	34
6 แสดงอุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ.....	35
7 แสดงเครื่องพีซีอาร์ และการจัดห้อง.....	36
8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการวิ่งอิเล็กโทรโฟริซิส.....	37
9 แสดงห้อง และอุปกรณ์ในการทำอิลเลโทรโฟริซิส.....	38
10 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษา.....	40
11 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษา gene deletion.....	41
12 ตัวอย่างสัญลักษณ์ที่ใช้ในการเขียนพงศาวลี.....	48
13 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 1.....	49
14 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 2.....	50
15 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 3 และ 4.....	51
16 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 5.....	52
17 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 6.....	53
18 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 7.....	54
19 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 8.....	55
20 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 9.....	56
21 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 10.....	57
22 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 11.....	58
23 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 12.....	59
24 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 13 และ 14.....	60

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
25 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 25.....	61
26 ภาพผู้ป่วยกล้ามเนื้อเสื่อมกลุ่มที่ 1.....	62
27 ภาพแสดงอาการ Gowers' sign.....	63
28 แสดงแบบแผนดีเอ็นเอผู้ป่วยรายที่ 1-4.....	64
29 แสดงแบบแผนดีเอ็นเอผู้ป่วยรายที่ 5-9.....	65
30 แสดงแบบแผนดีเอ็นเอผู้ป่วยรายที่ 10-14.....	66
31 แสดงแบบแผนดีเอ็นเอผู้ป่วยรายที่ 15-16.....	67
32 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 17 และ 18.....	70
33 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 19 และ 20.....	71
34 ภาพผู้ป่วยกล้ามเนื้อเสื่อมกลุ่มที่ 2.....	72
35 ภาพแสดงอาการผู้ป่วยกลุ่มที่ 2.....	73
36 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 21-26.....	75
37 พงศาวลีของผู้ป่วยรายที่ 27.....	76
38 ภาพผู้ป่วยกล้ามเนื้อเสื่อมกลุ่มที่ 3.....	77
39 ภาพแสดงอาการผู้ป่วยกลุ่มที่ 3.....	78

คำอธิบายคำย่อ



A	absorbance
BMD	Becker muscular dystrophy
bps	base pairs
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CPK	creatine phosphokinase
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanine triphosphate
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
dTTP	deoxythymine triphosphate
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
EDTA	ethylene diamine tetra acetate
ECG	electro cardiograph
EMD	Emery-Dreifuss muscular dystrophy
EMG	electro myograph
HCl	hydrochloric acid
Kb	kilobase
LGMD	limb-girdle muscular dystrophy
M	molar
mM	millimolar

μM	micromolar
mg	milligram
Mg	magnesium
MgCl ₂	magnesium chloride
mRNA	messenger ribonucleic acid
μg	microgram
μl	microlitre
Na	sodium
ng	nanogram
nm	nanometre
O.D.	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	picogram
pmol	picomole
RNA	ribonucleic acid
rpm	round per minutes
SDS	sodium dodecyl sulfate
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
WBC	white blood cell