

**การศึกษายีน GH-1 ในครอบครัวผู้ป่วยที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติ
จากการขาดฮอร์โมนเติบโต**

นายสรารุณี สิทธิกุล



**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541**

ISBN 974-639-724-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**STUDY OF GH-1 GENE IN FAMILIAL ISOLATED GROWTH HORMONE -
DEFICIENT PATIENTS**



Mr. Sarawut Sittigul

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics**

**Department of Botany
Graduate School**

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-639-724-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษายีน GH-1 ในครอบครัวผู้ป่วยที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติ
จากการขาดฮอร์โมนเติบโต

โดย

นายสรวิทย์ สิทธิกุล

ภาควิชา

พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์พรณี ชีโนรักษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์สมทรง เลขะกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุตินวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์พรณี ชีโนรักษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์สมทรง เลขะกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกุล)

ศราวณี สิทธิกุล : การศึกษายีน GH-1 ในครอบครัวผู้ป่วยที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติจากการขาดฮอร์โมนเติบโต (STUDY OF GH-1 GENE IN FAMILIAL ISOLATED GROWTH HORMONE- DEFICIENT PATIENTS) อ.ที่ปรึกษา : ร.ศ. พรรณี จิโนรักษ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ร.ศ. สมทรง เลขะกุล, 81 หน้า. ISBN 974-639-724-9.

จากการศึกษายีน GH-1 ใน 12 ครอบครัวจากโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีภาวะขาดฮอร์โมนเติบโต 19 ราย สมาชิกครอบครัวผู้ป่วย 20 ราย เทียบกับคนปกติ 10 ราย โดยเทคนิค PCR และจากการวิเคราะห์ยีนด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *Sma* I, *Hae* II และ *Bgl* I. ตามลำดับไม่พบว่ามีภาวะขาดหายไประหว่างยีน GH-1 ส่วนการวิเคราะห์เรื่อง mutation ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Fok* I ไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงของเบสในอินทรอน 3 แต่เมื่อศึกษายีน GH-1 ต่อโดยวิธี dideoxy fingerprinting และ sequencing analysis พบว่าใน 1 ครอบครัวมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสของยีนดังนี้

บริเวณเอกซอน 1 ทั้งพ่อแม่และลูกมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสจาก C เป็น G ในตำแหน่งที่ 5 แบบเฮเทอโรไซกัส และเฉพาะพ่อมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสจาก T เป็น C ในตำแหน่งที่ 6 แบบเฮเทอโรไซกัส

บริเวณอินทรอน 1 ที่เบสดำแหน่งที่ 18 พ่อมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสจาก C เป็น G-A แบบเฮเทอโรไซกัส ส่วนแม่และลูกมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสจาก C เป็น G แบบเฮเทอโรไซกัสและทั้งพ่อแม่และลูกมีการขาดหายไประหว่างเบส AT ในตำแหน่งที่ 64 และ 65 ตามลำดับ

บริเวณอินทรอน 3 พ่อมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสแบบเฮเทอโรไซกัส 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 17 T เป็น G และตำแหน่งที่ 26 G เป็น C

บริเวณอินทรอน 4 แม่มีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสดำแหน่งที่ 90 T เป็น A แบบโฮโมไซกัส การเกิด mutation บนยีน GH-1 ดังกล่าวมานี้น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะขาดฮอร์โมนเติบโตของผู้ป่วยที่ศึกษาในครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....
สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....
ปีการศึกษา.....2541.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

397290322 MAJOR GENETICS

KEY WORD: GH-1 GENE, GROWTH HORMONE DEFICIENCY.

SARAWUT SITTIGUL : STUDY OF GH-1 GENE IN FAMILIAL ISOLATED GROWTH HORMONE-DEFICIENT PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PANNEE CHINORAKSA THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. SOMSONG LEKHAKULA, 81 pp. ISBN 974-639-724-9.

Nineteen isolated growth hormone-deficient patients, twenty family members from 12 families, Siriraj Hospital were studied for growth hormone deficiency comparing with 10 normal controls by PCR technique and restriction enzyme analysis (*Sma* I, *Hae* II and *Bgl* I respectively). It was found that there is no deletion of GH-1 gene.

However, point mutation was screened by restriction enzyme *Fok* I, it was found that no base substitution occurred in the intron 3. But the studies of utilizing DNA sequence analysis of PCR amplification products have detected point mutations of the GH-1 gene. It was found that in one family base substitutions appear as the following :

Exon 1, parents and child are heterozygous for a C→G transversion at the 5th base and father is heterozygous for a T→C transition at the 6th base.

Intron 1, at the 18th base, father is heterozygous for a C→G-A transversion. Mother and child are heterozygous for a C→G transversion and found 2 bases deletion (AT) at the 64th and 65th base respectively in parents and child.

Intron 3, father is two heterozygous for a T→C transition and G→C transversion at the 17th and 26th base respectively.

Intron 4, mother is homozygous for a T→A transversion at the 90th base. From these results we can say that point mutations of GH-1 gene were probably the cause of the growth hormone deficiency of the patients.

ภาควิชา.....
พันธุศาสตร์

สาขาวิชา.....
พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา.....
2541

ลายมือชื่อนิสิต.....
สาราวุต สิตกุล

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
อ. ปันnee ชินอรaksa

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
อ. สมsong เลขกุล



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีรายนามดังต่อไปนี้

รองศาสตราจารย์ พรรณี ชีโนรักษ์ และรองศาสตราจารย์ สมทรง เถชะกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรฤดี จุฬาลักษณ์านุกุล ที่ได้ให้คำแนะนำแก้ไขข้อบกพร่อง จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ ที่ได้ช่วยเหลือ และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการวิจัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วน และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โรงพยาบาลศิริราช ที่เชื้อเพื่อ วัสดุ อุปกรณ์ ตลอดจนสถานที่ที่ใช้ในการทำวิจัยโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณอารีย์ พุฒระกุล นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี โรงพยาบาลศิริราช ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ความรู้ และช่วยแก้ปัญหาในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยต่อมไร้ท่อทุกคนที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย และการจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา คุณยาย และพี่ๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ และกำลังทรัพย์เสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
คำอธิบายคำย่อ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. การตรวจสอบเอกสาร.....	3
3. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	21
4. วิธีดำเนินการศึกษา.....	26
5. ผลการศึกษา.....	47
6. สรุปและอภิปรายผลการศึกษา.....	63
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	70
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การจำแนกชนิดของ Isolated growth hormone deficiency.....	13
4.1	แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบปกติ และแบบที่มีการขาดหายไปของยีน ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sma</i> I, <i>Hae</i> II และ <i>Bgl</i> I.....	34



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปรภาพ

รูปที่	หน้า	
2.1	แสดงลำดับกรดอะมิโนของ 22 KDa hGH.....	4
2.2	แผนภูมิแสดงฤทธิ์ของ hGH.....	7
2.3	แสดง hGH gene cluster และตำแหน่งบนโครโมโซมแท่งที่ 17.....	9
2.4	แสดงตำแหน่งการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Bam</i> HI บน growth hormone gene cluster.....	17
2.5	แสดงขนาดของ flanking region ของยีน GH-1 และ การขาดหายไปของยีนขนาดต่างๆ.....	18
2.6	แสดงการขาดหายไปของยีนขนาดใหญ่.....	19
4.1	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด.....	27
4.2	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมจีโนมดีเอ็นเอ.....	29
4.3	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาการขาดหายไปของยีน GH-1.....	30
4.4	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำความสะอาด PCR product.....	32
4.5	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาการเกิด point mutation บริเวณอินทรอน 3.....	35
5.1	แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1900 และ 1919 bp.....	47
5.2	แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (1900, 1919 bp) ซึ่งถูกตัดด้วย <i>Sma</i> I.....	48
5.3	แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (1900, 1919 bp) ซึ่งถูกตัดด้วย <i>Hae</i> II.....	49
5.4	แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (1900, 1919 bp) ซึ่งถูกตัดด้วย <i>Bgl</i> I.....	50
5.5	แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 258 bp.....	52
5.6	แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 258 bp เมื่อถูกตัดด้วย <i>Fok</i> I.....	53
5.7	แสดงพงศาวลีครอบครัวที่พบความผิดปกติของยีน GH-1.....	54
5.8	แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2.6 kb.....	55
5.9	แสดงผล dd F ของครอบครัวที่พบความผิดปกติ.....	56
5.10	แสดงผล dd F ของครอบครัวที่พบความผิดปกติ (ต่อ).....	57
5.11	แสดงผลการทำ sequencing analysis เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 41.....	59
5.12	แสดงผลการทำ sequencing analysis เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 41 (ต่อ).....	60
5.13	แสดงผลการทำ sequencing analysis เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 47.....	61
5.14	แสดงผลการทำ sequencing analysis เมื่อใช้ไพรเมอร์ GH # 37.....	62

คำอธิบายคำย่อ

APS	ammonium persulfate
bp	base pair
ddF	dideoxy fingerprinting
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
Da	dalton
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetra acetate
GH	growth hormone
GHD	growth hormone deficiency
GHRH	growth hormone releasing hormone
GHIF	growth hormone inhibiting factor
hGH	human growth hormone
Ig (G, A, M, E)	immunoglobulin (G, A, M, E)
IGFs	Insulin-like growth factor
IGHD	Isolated growth hormone deficiency
kb	kilobase
kDa	kilodalton
M	molar
ml	millilitre
mRNA	messenger ribonucleic acid
mM	milimolar
μ g	microgram
μ l	microlitre
μ M	micromolar
PCR	Polymerase chain reaction
pmol	picomole
RIA	Radioimmunoassay
rpm	round per minutes
SDS	sodium dodecyl sulfate