

Diagnostik molekular thalassemia

Sunarto

Bagian Ilmu Kesehatan Anak FKUGM/SMF Kesehatan Anak RSUP DR. Sardjito
Yogyakarta

ABSTRACT

A diagnosis of thalassemias has advanced from clinical to molecular in concordance with the advances in molecular biology. Since the introduction of polymerase chain reaction procedure - a practical in vitro procedure of deoxyribonucleic acid amplification - various diagnostic methods have been developed, to detects either gene deletions or point mutations. In a population where the spectrum of mutations is not too heterogenous, direct methods such as dot blot or reverse dot blot hybridization, ligase chain reaction and amplification refractory mutation system may be applied with high effectivity dan efficiency. But, in a population where the spectrum of mutations is very heterogenous other methods such as mismatch analysis, denaturing gradient gel electrophoresis and single strand conformation analysis as the screening step followed by deoxyribonucleic acid sequencing are chosen. Each of the above methods has advantages and shortcomings, in relation to various problems among others the sensitivity, the specificity, the ease, the reproducibility and the cost.

In this paper the molecular diagnostics, concerning the principle, the advantages and the shortcomings, especially that have been used in the field are discussed.

Key words: gene disorders - ligase chain reaction - dot blot and reverse dot blot hybridization - amplification refractory mutation system - denaturing gradient gel electrophoresis - single strand conformation analysis - chemical cleavage of mismatch

(Berkala Ilmu Kedokteran Vol. 28, No. 1: 44-51, Maret 1996)

PENDAHULUAN

Thalassemia merupakan sekumpulan sindroma klinik yang disebabkan oleh defek sintesis globin yang menyusun hemoglobin (Hb). Dasar molekular penyakit ini adalah kelainan gena (delesi atau mutasi noktah) yang menyandi sintesis rantai polipeptid globin (α , β , γ atau δ atau kombinasi). Thalassemia- β disebabkan terutama oleh mutasi noktah, sedangkan thalassemia- α terutama oleh delesi gena- α sebagian atau seluruhnya. Lebih dari 160 jenis mutasi pada gena- β ¹ dan hampir 200 jenis mutasi gena- α dan gena- β ² telah ditemukan. Diagnostik molekular thalassemia pada waktu ini tidak sekedar mempunyai kepentingan ilmiah, melainkan telah terbukti manfaatnya untuk kepentingan pengendalian thalassemia. Dengan menyertakan diagnosis (molekular) prenatal dalam program pengendalian thalassemia, di beberapa negara kelahiran bayi thalassemia dapat

ditekan menjadi 10% dari taksiran tanpa pengendalian^{3,4,5}.

Sejak metode penggandaan DNA (*deoxyribonucleic acid*) in vitro dengan cara *polymerase chain reaction* (PCR) diperkenalkan oleh pakar dari kelompok Cetus pada tahun 1985⁶ diagnostik kelainan gena, termasuk thalassemia, mengalami kemajuan sangat pesat. Sebelumnya, penggandaan DNA/gena dilakukan dengan kloning gena; cara ini rumit dan memakan waktu lama. Berpangkal pada PCR cara-cara diagnostik molekular yang praktis untuk digunakan sebagai prosedur rutin di lapangan telah banyak dikembangkan. Beberapa metode yang secara langsung mendeteksi mutan adalah *ligase chain reaction*⁷, *amplification refractory mutation system* (ARMS)^{8,9}, cara hibridisasi dengan probe oligonukleotid radioaktif maupun nonradioaktif^{10,11,12,13,14}. Cara-cara itu efektif bila jenis-jenis mutasi pada populasi yang diteliti telah diketahui. Apabila spektrum mutasi belum diketahui atau terlalu heterogen maka cara tidak langsung merupakan pilihan, antara lain adalah *chemical cleav-*

age of mismatch (CCM), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) dan single strand conformation analysis (SSCA)² dikombinasikan dengan pengurutan DNA (deoxyribonucleic acid sequencing).

Dalam makalah ini akan dibahas diagnostik molekular thalassemia, khususnya yang telah digunakan di lapangan, mengenai prinsip dan kelebihan serta kekurangannya.

PEMBAHASAN

Polymerase Chain Reaction

Pada awal pengembangannya PCR sebenarnya merupakan cara penggandaan DNA secara in vitro. Cara ini amat praktis, karena kecuali pelaksanaannya in vitro juga cepat, sensitif, relatif murah dan otomatisasi dapat diterapkan. Sebelum teknik PCR ditemukan, penggandaan DNA dilakukan dengan kloning gena yang memerlukan waktu sampai 10 hari¹⁵.

Prinsip PCR adalah⁶: bila DNA dicampur dengan oligonukleotid yang komplementer dan diberi kondisi yang sesuai, maka oligonukleotid tadi akan berperan sebagai titik awal (*primer*) sintesis *copy* dari DNA target. Dengan menggunakan dua *primer*, satu di sebelah hulu (5') dan satu di sebelah hilir (3') (*reverse primer*), segmen DNA yang terletak di antara kedua *primer* tadi akan tergandakan. Dalam satu siklus reaksi, satu untai DNA tunggal akan tergandakan menjadi 2 untai. Dengan n siklus, dari satu DNA untai tunggal teoretis akan dihasilkan 2^n *copy*. Dengan 25 siklus dari satu DNA untai tunggal akan dihasilkan lebih dari 30 juta *copy*.

Dengan enzim Taq yang tahan panas sampai 100°C, dapat dicapai otomatisasi pengerjaan dan segmen DNA berukuran sampai beberapa *kilo base pair* (kb) dapat digandakan¹¹ dalam waktu kurang dari 3 jam. Metode ini sangat sensitif, DNA sejumlah 1 µg telah cukup untuk sampel. Dari *single copy genes* dapat diperoleh sejumlah *copy* DNA cukup untuk dianalisis¹⁶. Setetes darah kering pada kertas saring cukup untuk mendeteksi mutasi gena globin¹².

Sensitivitas yang amat tinggi dari PCR justru menyebabkan berbagai masalah^{10,6}: DNA kontaminan yang amat sedikitpun (misalnya dari sel dalam ludah, serpih kulit dari pemeriksa) akan ikut tergandakan sehingga terbentuk sejumlah

copy DNA kontaminan. Penempelan primer secara non spesifik pada segmen DNA non target akan menghasilkan sejumlah *copy* DNA non target; hal ini dapat dihindari dengan membuat primer sespesifik mungkin, misalnya dengan menggunakan primer oligonukleotid yang tak terlalu panjang maupun terlalu pendek; Varawalla *et al.*, (1991)⁵ memasukkan *mismatched nucleotide*, yaitu pada -4 dari ujung 3' untuk mempertinggi spesifisitas primer. Pada PCR dengan jumlah siklus yang amat banyak, misalnya kalau sampel DNA terlalu sedikit, dapat terbentuk dimer dari primer; dimer akan terlihat sebagai DNA dengan ukuran kira-kira 40 bp (*base pair*), biasanya mudah dikenali sehingga tidak terlalu mengganggu. Kekurangan aktivitas polimerase dari Taq akan menyebabkan terjadinya salah baca dan salah penggabungan basa (*misincorporation*); penanganan cermat sangat diperlukan⁶.

Dengan PCR, delesi gena atau delesi sejumlah nukleotid dapat terdeteksi secara langsung dari gambaran elektroforesis DNA produk PCR berupa pita segmen DNA yang sekian bp lebih pendek daripada normal. Pada hidrop fetalis Hb Bart tidak terbentuk *copy* dari gena- α sebagai produk PCR¹⁵ karena penderita sama sekali tidak mempunyai gena- α yang bertindak sebagai cetakan (*template*). Winichagoon *et al.* (1989)¹⁷ melaporkan bahwa dengan PCR mampu dideeteksi delesi sepanjang hanya 4 bp pada kodon 41/42 (CTTT) dari gena- β .

Pembentukan dimer pada prosedur PCR dimanfaatkan untuk diagnostik (cara *ligase chain reaction/LCR*). Prinsip LCR adalah: dua oligonukleotid yang menghibridisasi segmen yang berdekatan dari DNA target dapat mengalami penyambungan (ligasi) bila ujung-ujungnya yang berdekatan komplementer dengan DNA target. Bila ujung 3' dari oligonukleotid yang berdekatan *mismatch*, maka ligasi tidak akan terjadi. Masalah yang muncul pada prosedur diagnostik ini adalah: 1) kita harus tahu lebih dulu spektrum mutasi dalam populasi untuk menyesuaikan oligonukleotid yang dipakai, 2) kondisi reaksi menuntut persyaratan yang lebih tinggi dibanding PCR biasa: kenaikan 5 unit enzim pada tiap reaksi atau dua kali lipat konsentrasi oligonukleotid, demikian pula jumlah siklus lebih dari 25 a 30 akan menyebabkan terjadinya reaksi bebas cetakan (*template free reaction*); oligonukleotid dengan

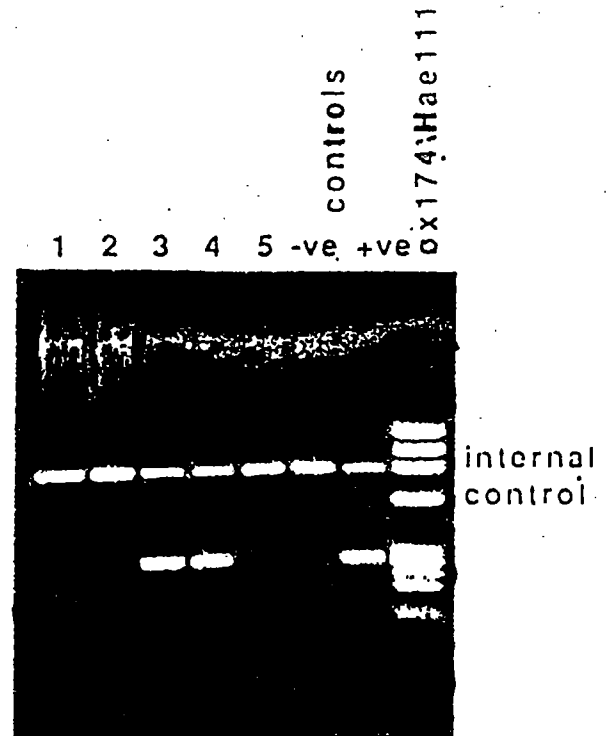
panjang tidak tepat atau tidak mengandung fosfat 5' akan menurunkan efisiensi reaksi yang berarti menurunnya sensitivitas⁷. Kelebihan metode ini adalah bahan radioaktif tidak diperlukan dan otomatisasi dapat diterapkan sehingga dapat dipakai untuk sejumlah besar sampel¹⁸.

Amplification Refractory Mutation System

Pada prosedur ARMS jenis mutan dapat dideteksi secara langsung dari produk PCR yang dielektroforesis^{8,9}. Pada sistem ini digunakan primer ARMS, yaitu oligonukleotid – terdiri atas 20-30 bp – yang komplementer dengan DNA mutan (primer ASO = *allele specific oligonucleotide primer*), sebagai *reverse primer*; nukleotid yang komplementer dengan mutan diletakkan pada ujung 3' dari primer ini. Primer ARMS untuk mutan tertentu akan merupakan *amplimer* hanya bagi mutan itu saja, dan tidak bagi DNA normal maupun mutan lain. Satu primer ARMS yang komplementer dengan segmen hilir DNA mutan tertentu bersama dengan satu *common primer* di segmen hulu akan menggandakan segmen DNA target yang terletak di antara kedua primer tersebut. Produk PCR adalah segmen DNA dengan ukuran mulai dari ujung 5' segmen hulu DNA target yang komplementer dengan *common primer* sampai ujung 3' segmen hilir DNA target yang komplementer dengan primer ARMS.

Untuk mendeteksi mutasi IVS-1 nt5(G-C) pada gena- β misalnya, digunakan primer ARMS 5'CTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTGTGTAAG 3' dan *common primer* 5' ACCTCACCCCTGTGGAGCCAC 3'⁹. Dengan primer tersebut akan diperoleh sejumlah besar *copy* DNA target dengan ukuran 285 bp, hanya kalau pada DNA target terdapat mutasi IVS-1 nt5(G-C) (nukleotid G pada ujung 3' dari primer ARMS komplementer dengan mutan C); DNA normal tidak akan tergandakan. Dalam tabung reaksi yang mengandung primer normal yang ujung 3'nya adalah C (komplementer dengan DNA normal), akan terjadi penggandaan DNA normal. Segmen DNA yang diperoleh kemudian dideteksi secara elektroforesis dengan pengecatan etidium bromid (GAMBAR 1). Dengan teknik ini dapat dideteksi mutan- β yang terdapat pada populasi India sebesar 87% dari sampel^{8,9}. Seperti pada PCR, cara

ini kurang efisien bila spektrum mutasi terlalu heterogen. Kelemahan-kelemahan dari PCR berlaku untuk prosedur ini.



GAMBAR 1. – Skrining mutasi IVS-1 nt5(G-C). Produk PCR dengan ukuran 285 bp pada jalur 3,4 dan kontrol positif menunjukkan adanya mutasi, sedangkan jalur 1, 2, 5 dan kontrol negatif menunjukkan tidak ada mutasi. Pita 861 bp pada kontrol internal dan pada semua jalur menunjukkan efikasi dari PCR. Petanda adalah ox 174 yang didigesti dengan Hae III⁹.

Dot-Blot Analysis

Cara diagnostik ini berprinsip hibridisasi. DNA hasil PCR didenaturasikan dan kemudian ditetaskan pada membran nilon dengan *dot-blot apparatus*. Nukleotid DNA itu kemudian dihibridisasikan dengan probe ASO. Probe ASO yang dipakai disesuaikan dengan mutan yang terdapat di suatu wilayah atau populasi yang diteliti. Untuk pembacaan, probe ASO dapat dilabel dengan P³² radioaktif; atau dengan metode pewarnaan probe ASO dilabel dengan digoksinagenin atau enzim seperti *horseradish peroxidase* atau fosfatase alkali^{19,20,21,22,23}. Metode ini sangat sensitif dan akurat, *kit* komersial non radioaktif sudah terdapat di pasaran untuk prosedur rutin, tetapi pengerjaannya memerlukan waktu dan

mahal. Masalah lain sama dengan metode langsung yang lain, kita harus telah mengetahui lebih dahulu spektrum mutasi di wilayah/populasi asal penderita, untuk membuat probe ASO; jika tidak atau jika jenis mutasi sangat beragam cara ini tidak efisien.

Reverse Dot-Blot Hybridization Technique (RDB)

Dot-blot analysis telah banyak digunakan, tetapi menyita waktu dan mahal. RDB merupakan pengembangan lebih praktis^{1,14}. Pada metode ini bermacam-macam probe ASO untuk mutan maupun untuk alel normal difiksasikan sebagai noktah-noktah pada lempeng nilon (*Biodyne C nylon membrane*). Probe ASO yang terfiksasi pada lempeng nilon tersebut stabil sepanjang waktu dan dengan aman digunakan di lapangan.

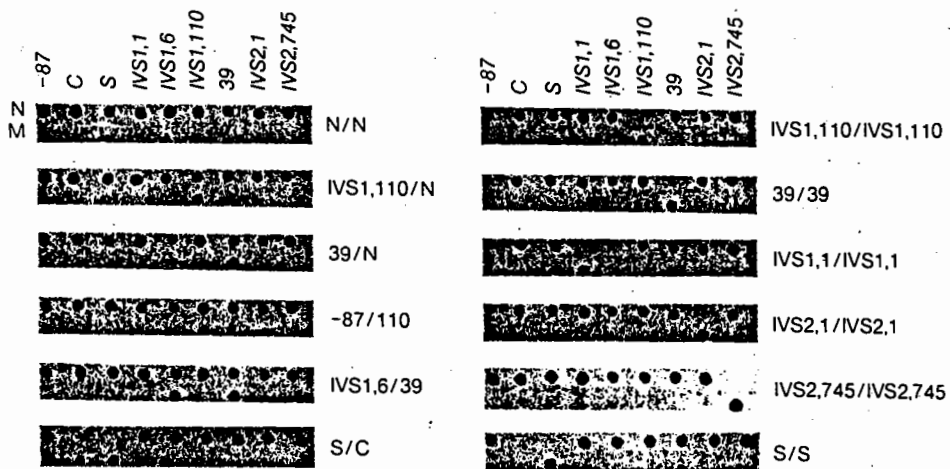
Pada pelaksanaannya, carik lempeng tadi dipaparkan pada DNA produk amplifikasi PCR yang telah didenaturasikan dengan pemanasan. Alel mutan akan mengalami hibridisasi dengan probe ASO yang sesuai pada carik lempeng tadi, sedangkan alel normal mengalami hibridisasi dengan probe ASO normal. Setelah pengerjaan dengan konjugat *streptavidin horseradish peroxidase* (HRP) atau *avidin alkaline phosphatase* (AP), deteksi warna dilakukan dengan substrat *nitroblue tetrazolium* (NTB) untuk AP atau *tetramethylbenzidine* (TMB) untuk HRP, sehingga hasilnya dapat dibaca langsung pada lempeng tersebut (GAMBAR 2). Keunggulan prosedur

RDB adalah: 1) tidak diperlukan bahan radioaktif; 2) tidak perlu elektroforesis, sehingga pelaksanaannya mudah dan relatif murah; 3) beberapa primer ASO dapat digunakan sekaligus. Carik-carik lempeng yang berisi bermacam-macam probe ASO yang diperlukan mudah disuplai untuk keperluan lapangan¹⁴. Meskipun cara ini lebih praktis daripada cara sebelumnya, namun tetap diperlukan memilih jenis probe ASO yang sesuai dengan jenis-jenis mutan yang sebelumnya telah ditemukan.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Metode ARMS maupun hibridisasi dapat digunakan efektif (sampai 87%) dan efisien bila jenis-jenis mutasi yang sering terdapat pada populasi telah diketahui sebelumnya^{8,9} atau jenis mutasi tidak terlalu heterogen. Di Nederland, dimana spektrum mutasi-β sangat heterogen, dengan menggunakan 15 probe ASO Loosekoot *et al.*²⁴ tidak dapat mengidentifikasi sekitar 20% dari alel thalassemia-β yang diteliti. Untuk mutan yang tidak teridentifikasi diperlukan teknik pemeriksaan lain. DGGE merupakan salah satu pilihan, khususnya sebagai uji saring cepat²⁵ sebelum pengurutan DNA. Metode ini dapat juga mengenali mutan secara langsung tanpa memerlukan pengurutan DNA, bila pada elektroforesis disertakan kontrol^{24,26}.

DGGE menggunakan prinsip:²⁷ bila fragmen DNA untai ganda dilewatkan pada elektroforesis gel poliakrilamid yang mengandung agen dena-

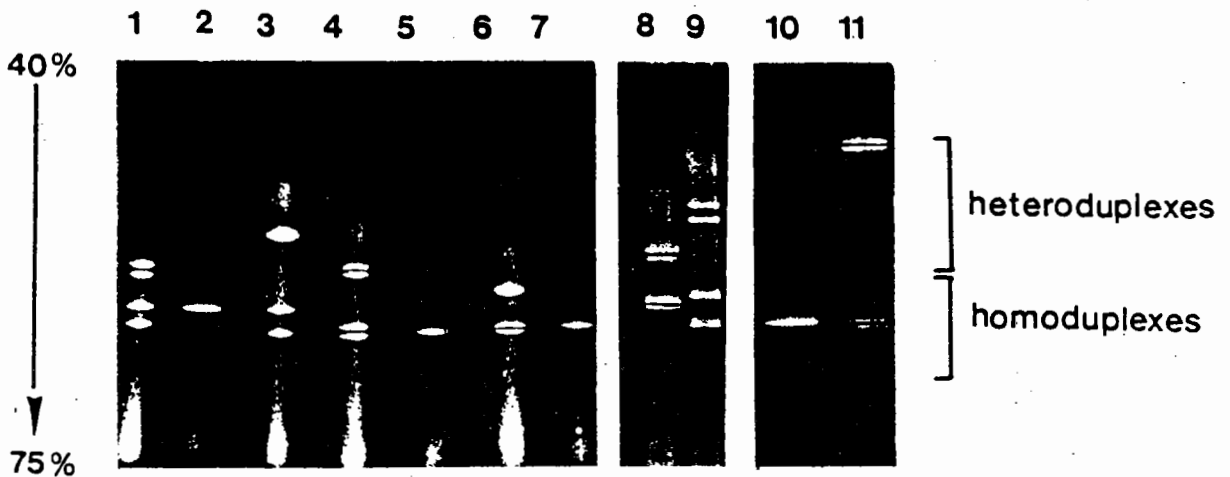
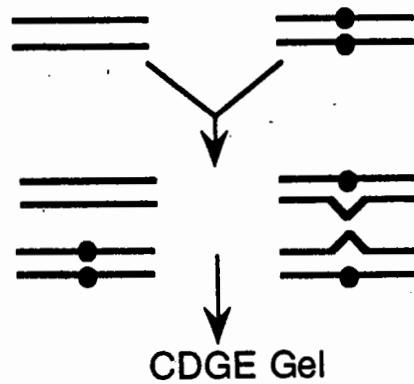


GAMBAR 2. – Contoh hasil pemeriksaan dengan RDB¹⁴.

turasi dengan konsentrasi yang makin meningkat, maka DNA tadi akan mengalami denaturasi pada titik konsentrasi tertentu (T_m). Pada titik dimana DNA tadi mengalami denaturasi parsial, mobilitas elektroforesisnya akan sangat melambat. T_m untuk fragmen DNA tertentu bergantung kepada urutan nukleotid dari DNA tersebut. Dua molekul DNA untai ganda yang mempunyai perbedaan meskipun hanya satu nukleotid tunggal akan dapat terdeteksi (GAMBAR 3). DGGE cocok untuk uji saring mutasi noktah dan insersi/delesi kecil gena- β yang kaya akan AT, sedangkan

untuk gena- α yang kaya GC ada kesulitan dengan beberapa fragmen. Dengan DGGE saja mampu diidentifikasi hingga 88,5% dari alel thalassemia- β di Nederland²⁶. Sampel yang tidak terdeteksi secara langsung perlu pengurutan DNA.

DGGE telah luas digunakan dalam penelitian maupun diagnostik berbagai kelainan genetik (25) dengan keunggulan: 1) sensitivitasnya sangat tinggi (untuk thalassemia- β mencapai 99%); 2) deteksi heterozigot bertambah baik (gambaran dua homodupleks dan dua heterodupleks); 3) kemungkinan optimasi analisis dengan simulasi

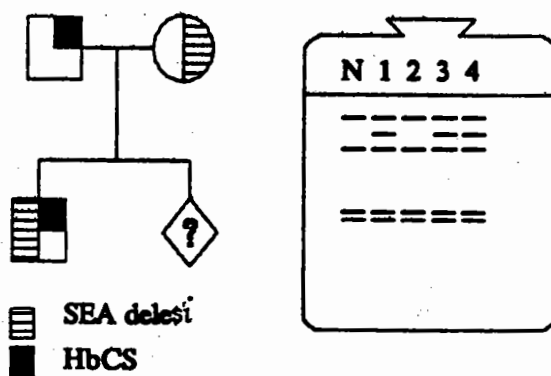
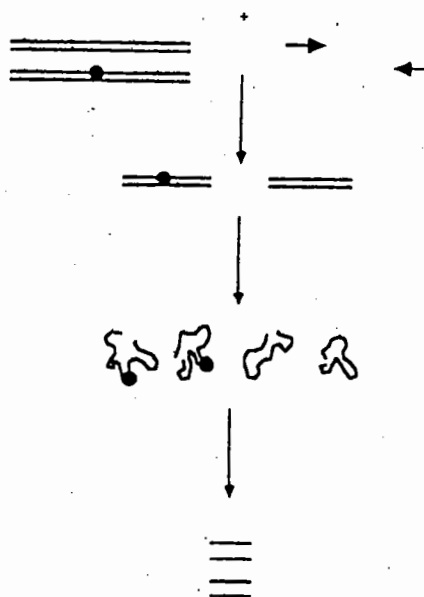


GAMBAR 3. — A.Bagan prinsip DGGE; B.Hasil DGGE β -globin. Jalur: 1. heterozigot untuk polimorfisme pada kodon 2; 2. homozigot untuk polimorfisme pada kodon 2; 3. heterozigot ganda untuk mutasi +1 kodon 8-9 dan polimorfisme pada kodon 2; 4. heterozigot untuk mutasi -2 kodon 5; 5. homozigot Hb S; 6. heterozigot Hb S; 7. kontrol normal; 8. heterozigot ganda untuk mutasi +1 kodon 8-9 dan polimorfisme pada kodon 2; 9. heterozigot untuk mutasi -2 kodon 5 dan polimorfisme pada kodon 2; 10. kontrol normal; 11. heterozigot untuk mutasi -2 kodon 8. Angka persentase di kiri menunjukkan persentase denaturasi²⁴.

komputer; 4) non radioaktif; 5) isolasi yang mudah dari alel untuk determinasi berikutnya dari urutan. Sebaliknya, DGGE mempunyai masalah: 1) persiapan yang rumit dan memakan waktu sebelum prosedur DGGE sendiri; 2) sintesis yang mahal dari primer yang relatif panjang (kurang lebih 60 nukleotid/nt); 3) panjang DNA yang dapat dianalisis secara efisien dengan cara DGGE terbatas (sampai kira-kira 500 bp). Betapapun, menurut Losekoot *et al.*²⁴ kombinasi teknik DGGE dan pengurutan DNA merupakan alternatif yang valid, terutama untuk populasi dengan jenis mutasi yang sangat heterogen.

Single Strand Conformation Analysis

Prinsip dan pelaksanaan prosedur ini sangat sederhana, yaitu bahwa molekul DNA untai tunggal (*single stranded DNA*) pada kondisi non-denaturasi akan melipat menjadi struktur sekunder yang distabilisasikan oleh interaksi intramolekular. Molekul DNA dengan substitusi satu basa akan mempunyai konformasi yang berbeda dengan molekul DNA normal aslinya dan akibatnya mempunyai kecepatan migrasi yang berbeda, sehingga dapat terdeteksi pada gel akrilamid non-denaturasi (GAMBAR 4). Cara ini murah, *reproducible* dan telah banyak digunakan. Sebagai suplemen, SSCA melengkapi kekurangan DGGE untuk uji saring untuk gena- α ²⁶. Dengan optimasi, untuk DNA 191 bp efektifitas dapat mencapai 100%²⁸. Kelemahan prosedur ini adalah efisiensinya yang tergantung pada ukuran fragmen, 97% untuk DNA ukuran 155 bp, hanya 3% untuk fragmen 600 bp; untuk DNA terlalu pendek juga menurun sensitivitasnya (73% untuk DNA 95 bp)²⁵. Bentuk akhir dari konfigurasi tergantung pada keseluruhan urutan basa dalam molekul, sehingga sensitivitasnya bervariasi dari fragmen ke fragmen. Posisi mutan tidak banyak mempengaruhi mobilitas migrasi. Banyak lagi faktor yang dapat berpengaruh seperti suhu, kekuatan ion, ukuran lubang dan konsentrasi gel akrilamid dan pH. Karena itu optimasi cara ini sangat empirik. Kesulitan-kesulitan tersebut dapat diatasi dengan penggunaan kit komersial. Penggunaan kit juga membuat cara ini amat mudah dan cepat^{2,18}.



GAMBAR 4. – A.Bagan prinsip SSCA; B.Diagnosis prenatal dengan SSCA: N. alel normal; 1. ayah Hb Constant Spring (Hb CS); 2. ibu α^{SEA} ; 3. kakak Hb CS/ α^{SEA} ; 4. vili koriales².

Chemical Cleavage Mismatch

Prinsip cara ini adalah: produk penggandaan dari alel heterozigot terdiri dari campuran dua homodupleks dan dua heterodupleks. Tempat basa atau basa-basa yang tak-serasi (*mismatch*) dapat dipecah oleh endonuklease atau reagen kimiawi sehingga terbentuk fragmen-fragmen yang ukurannya ditentukan oleh posisi dari basa yang tak-serasi tadi di sepanjang urutan DNA. Tanpa tergantung pada jenis mutasi, setidaknya salah satu dari heterodupleks yang terjadi dari hibridisasi untai tipe alami dan mutan akan mengandung basa tak-serasi yang dapat dipecah oleh reagen kimia (C dan T berturut-turut oleh hidroksilamin dan osmium tetroksid)^{18,23,29}. CCM mampu mendeteksi sebagian besar dari mutasi dalam fragmen DNA dengan ukuran relatif besar (1-2kb) dan menunjukkan secara tepat posisi relatif dari mutasi; sensitivitasnya dapat mencapai 100%. Masalah pada CCM adalah spesifisitasnya rendah, menyita tenaga karena memerlukan banyak langkah, menggunakan bahan kimia yang toksik dan bahan radioaktif sehingga kurang cocok untuk uji saring rutin. Juga masalah mendasar timbul dari kualitas bahan kimia^{18,25}. Untuk mengurangi jumlah langkah, para pakar mencoba menggunakan endonuklease, misalnya *T4-endonuklease VII* sebagai ganti bahan kimia. Menurut Cotton & Youil³⁰, dengan enzim ini dicapai efektivitas setidaknya 98%.

KESIMPULAN

Banyak cara diagnostik molekular thalassemia telah dikembangkan, khususnya yang berkaitan dengan substitusi basa, insersi/delesi kecil. Beberapa diantaranya dapat digunakan sebagai prosedur rutin, meskipun tidak setiap laboratorium dapat menggunakan semua metode sekaligus atas alasan efisiensi. Untuk diagnostik terhadap sampel yang berasal dari populasi dengan spektrum mutasi gena globin yang telah diketahui dapat digunakan cara langsung seperti *dot-blot* atau *reverse-dot blot hybridization*, prosedur *amplification refractory mutation system* dan *ligase chain reaction*, sedangkan untuk sampel yang berasal dari populasi yang spektrum mutasinya belum diketahui atau sangat heterogen dipilih

cara tidak langsung seperti *chemical cleavage of mismatch*, *denaturing gradient gel electrophoresis* dan *single strand conformation analysis*. Masing-masing cara mempunyai keunggulan maupun kekurangan atau masalah, khususnya dalam kaitan dengan sensitivitas, spesifisitas, kesulitan pelaksanaan, risiko bagi lingkungan sekitar, waktu, biaya dan keterlaksanaannya untuk penggunaan di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dra. F. Lani, SU PAU-UGM yang telah membaca naskah ini dan menyampaikan komentarnya.

KEPUSTAKAAN

1. Nopparatama C. Reverse dot blot hybridization : A screening technique for β -thalassemia alleles. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations. August, 1-5th 1994.
2. Keilman MF, Hertevelde KL & Bernini L. Point mutation detection by single strand conformation analysis. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations. August, 1-5th 1994.
3. WHO Working Group. Hereditary anaemias genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment Bull World Health Org 60:643-60, 1982.
4. WHO. Community control of hereditary anaemias: Memorandum from WHO meeting. Bull World Health Org 61:63-80, 1983.
5. Angastiniotis MA, Hadjiminias MG. Prevention of thalassemia in Cyprus. Lancet I:369-71, 1981.
6. Arnheim N & Levenson CH. Polymerase chain reaction. CAEN Special Report. October, 1990.
7. Huiet L, Tumolo A & Witney Introduction to ligase chain reaction. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations. August, 1-5th 1994.
8. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of β -thalassemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK. Lancet II:834-37, 1990.
9. Varawalla NY, Old JM, Sarkar R, Venkatesan R and Weatherall DJ. The spectrum of β -thalassemia mutations on the Indian subcontinent: the basis for prenatal diagnosis. British J Haemat 78:242-7, 1991.
10. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Haig MS, et al. Diagnosis of sickle anemia and β -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med 319:53741, 1988.
11. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-91, 1988.
12. Huang SZ, Zhou XD, Zhu H, Ren ZR, and Zeng YT. Detection of β -thalassemia mutations in Chinese using

- amplified DNA from dried blood specimens. *Hum Genet* 84:129-31, 1989.
13. Lie-Injo LE, Cai SP, Iskandar Wahidiyat, Moeslichan S, Lim ML, Evangelista I, et al. B-thalassemia mutation in Indonesia and their linkage to β -haplotype. *Am J Hum Genet* 45:971-5, 1989.
 14. Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kan YW, and Chebab FF. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean β -thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: Application to prenatal diagnosis to Sicily. *Blood* 81:239-42, 1993.
 15. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairoam V, Siribon W, Siritanarakul N, Kanokpongsakdi et al. Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand : Experiences from 100 pregnancies. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 22:16-29, 1991.
 16. Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Higuchi RG, Ehrlich HA and Kazazian Jr HH. 1987 Characterization of β -thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 330:384-6, 1987.
 17. Winichagoon P, Kownkon J, Yetchinsomanus P, Thonglairoam V, Siritanarakul N, & Fucharoen S. Detection of β -thalassemia and hemoglobin E gene in Thai by a DNA amplification technique. *Hum Genet* 82:389-90, 1989.
 18. Bernini LF, Detection of point-mutations. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations. August, 1-5th, 1994.
 19. Cheng TC, Orkin SH, Antanarokis SE, Poiter MJ, Sexton JP, Markham AF. β -thalassemia in Chinese use of in vivo mRNA analysis and oligonucleotide hybridization in systemic characterization of molecular defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2821-25, 1984.
 20. Winichagoon P. Detection of β -thalassemia mutations by radioactively labeled oligonucleotide probes. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations, August, 1-5th, 1994.
 21. Winichagoon P, Fucharoen S, Siritanarakul N, Thonglairoam V and Siribon W. Detection of β -thalassemia mutations by HRP- labeled allele-specific oligonucleotide probes. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations, August, 1-5th, 1994.
 22. Nopparatama P, Panich V, Saechan V, Nopparatama C, Rungjeadpha J, Pornpatkul M et al. Nonradioactive hybridization. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations, August, 1-5th, 1994.
 23. Wilairat P. Application of PCR in the diagnosis of single base mutations. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations, August, 1-5th, 1994.
 24. Losekoot M, Fodde R, Hartevelde CL, van Heeren, Giordano PC, Bernini LF et al. Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA : a rapid and reliable diagnosis approach to beta thalassemia. Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations, August, 1-5th, 1994.
 25. Fodde R and Losekoot M. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations, August, 1-5th, 1994.
 26. Keilman MF, Hertevelde KL & Bernini L. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Asia-Pacific Course on the Detection of Single Base Mutations, August, 1-5th, 1994.
 27. Myers RM, Maniatis T, and Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymol*, 155:501-27, 1987.
 28. Ellison J, Dean M & Goldman D. Efficacy of fluorescence-based PCR-SSCP for detection of point mutations. *Biotechniques* 15:684-91.
 29. Dahl HHM, Lamande SR, Cotton RGH, and Batemen JF. Detection and localization of base changes in RNA using a chemical cleavage method. *Analyt Biochem*, 183:263-8, 1989.
 30. Cotton RGH, Youil Y. Mutation detection and new enzyme method using T4 endonuclease VII. Second Asia-Pacific Conference on Medical Genetics and Eijkman Symposium on the Molecular Biology of Disease. Jakarta, 19-23 September 1995.