รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กษม อายุการ, กุลนภา ฟู่เจริญ, สุพรรณ ฟู่เจริญ. 2539. ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในกลุ่มชาวลาวโซ่ง จังหวัดสุพรรณบุรี เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด. 8 : 149-153.

กุลนภา ฟู่เจริญ. 2539. การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า. การทดลองทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จิตร ภูมิศักดิ์.2519. ความเป็นมาของคำสยาม ไทย ลาว และขอม และลักษณะทางสังคมของชื่อชนชาติ. มูลนิธิโครงการตำราสังคมศาสตร์และมนุษยศาสตร์. สมาคมสังคมศาสตร์แห่งประเทศไทย.กรุงเทพมหานคร.

ชื่น ศรีสวัสดิ์. 2529. การเลี้ยงช้างของชาวไทย-กุย (ส่วย) ในจังหวัดสุรินทร์. รายงานผลการวิจัยทางวัฒนธรรมในโครงการสนับสนุนการวิจัยทางวัฒนธรรม. มูลนิธิ เคมส์ เอส ดับเบิ้ลยูทอมป์สัน.

ถวัลย์วงศ์ รัตนสิริ, สุพรรณ ฟู่เจริญ และคณะ. 2539. การศึกษาอุบัติการณ์ของอัลฟ่าธาลัสซีเมียจากเลือดสายสะดือของทารกแรกเกิดที่ ร.พ. ศรีนครินทร์. เสนอในการประชุมการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียครั้งที่ 4 ขอนแก่น 21-22 พฤศจิกายน

บุญยงค์ เกศเทศ. 2536. วัฒนธรรมเผ่าพันธุ์. ยงสวัสดิ์การพิมพ์. อุบลราชธานี.

ประเวศ วะสี. 2534. บนเส้นทางชีวิตเล่ม 2. หมอชาวบ้าน 15 : 37-38.

ไพฑูรย์ มีสกุล. 2531. การศึกษากลุ่มชาติพันธุ์ในประเทศไทย(ไทยกวย). สมาคมสังคมศาสตร์แห่ง ประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร.

พรรณี ชิโนรักษ์ และมุกดา ตู้หิรัญ. 2534. การศึกษาและการจัดการภาวะโลหิตจางเพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตของประเทศไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (โครงการต่อเนื่อง).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เยาวลักษณ์ วิลัย. 2538. การศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในชาวชอง และซาไก. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

รักษพล สกุลวัฒนา. 2538. คนเลี้ยงช้างชาวไทยกวยจังหวัดสุรินทร์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะสังคมวิทยาและมนุษย์วิทยา. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

วิชัย เหล่าสวัสดิ์. 2541. ธาลัสซีเมีย. กรุงเทพฯ : โอเอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ : เอ็นพีซับพลายพริ้นติ้ง.

สมทรง บุรุษพัฒน์. 2538. สารานุกรมชนชาติกูย(ส่วย)ไทย-อังกฤษ. สถาบันวิจัยภาษาและวัฒนธรรมเพื่อพัฒนาชนบท มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

สิริวัฒน์ คำวันสา. 2524. ส่วย(กูย) ในอีสานปริทัศน์(อีสานคดี 2). คณะโบราณคดี มหาวิทยาลัยศิลปากร. หน้า. 28-42.

สุทัศน์ ฟู่เจริญและปราณี ฟู่เจริญ. 2526. Beta- globin gene cluster. สงขลานครินทร์เวชสาร. ฉบับที่ 4 : 281-298.

สุเรขา สุพรรณไพบูลย์. 2530. ชาวชอง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

เสมอชัย พูลสุวรรณ. 2536. วิวัฒนาการของ beta-globin polymorphism ในประเทศไทย. บทคัดย่อการสัมนาครั้งที่ 8 เรื่องพันธุศาสตร์ยุคใหม่ มหาทยาลัยมหิดล.

อุรศรี สูยะศุนานนท์. 2539. ศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีในไทยพวนจังหวัดลพบุรี. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาพฤกษศาตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Antonarakis, S.E., Kazazian, H.H.Jr., Orkin, S.M. 1985. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster. Hum Genet 69: 1-14.

Antonarakis, S. E., Orkin, S. H., Kazazian, H .H., Goff, S. C., Boechm, C.D., Waber, P.G., et al. 1982b. Evidence for multiple origins of the β^{E} –globin gene in Southeast Asian. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79 : 6608-6611.

Breunig, MH., Madan, K.m Verjaal, M., Wijnen, J. T., Meera Khan, P., and Pearson, P. L. 987. Human α-globin maps to pter-p13.3 in chromosome 16 distal to PGP. Hum Genet. 76 : 287.

Bunn, H. F., Foeget, B. G. and Ranney, H. M. 1977. Human Hemoglobin. Philadelphia. 193-222.

Chakravarti, A., Buetow, KH., Antonarakis. S.E., Waber, P.G., Boechm, C.D., and Kazazian, H.H.Jr.1984. Non-uniform recombination within the human α–globin gene cluster. 12 : 456 459. Am. J. Human Genet.

Charies, K.1982. Ethnic Chang. University of washington press.

Chernoff, A.I., Minnich, V., Chongharoensuk, S. 1954. Hemoglobin E.a hereditary abnormality of human hemoglobin. Science. 120 : 605.

Clegg, J.B. and Weatherall, D.J., 1974. Haemoglobin Constant Spring. Anunusual α– chain Variant involed in the etiology of hemoglobin H disease. Ann NY Acad Sci. 232 : 168-178.

Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P., Velez, R., Anderson, W. F., Ruddle, F., and et al. 1977. Localization of the human α-globin by molecular hybridization assay. Cell. 12 : 205.

Deka, R., Gogoi, B-C., Hundrieser. J. and Flatz, G. 1987. Hemoglobinopathies in Northeast India. Hemoglobin. 11 : 531-538.

Embury, S. H., Miller, J. A., Dozy, A. M., Chan, V. and Todd, D. 1980. Two different Molecular organizations account for the single α- globin gene of the α– thalassemia genotype. J Clinical Invest. 66 : 1319-1325.

Fischel-Ghodsian, N.,Hirsch PC. And Bohlman, M. Rapid detection of the hemoglobin C mutation by Allele Specific Polymerase Chain reaction. Am J Hum Genet. 47 : 1023 – 4.

Flatz, G., Pik, G., Sringam, S. Hemoglobin E and β–thallassemia. Their distribution in Thailand. Ann Hum Genet. 29: 151-170.

Flatz, G. 1967. Hemoglobin E distribution and population dynanics. Human Genetic 3: 189-234.

Forget, B. G., Pearson, H. A. 1995. Hemoglobin synthesis and Thalassemia. J. B. Lippicott. 1590-1598.

Fucharoen, Sp., Fucharoen, G. Jetsrisuparb, A., and Fukumaki, Y. 1994. Allele Specific Polymorase Chain Reaction for nonradioactive deletion of Hb E gene. Clin Chim Acta. 229 : 197-203.

Fucharoen, Sp., Fucharoen, G. and Fukumaki, Y. 1990. Sample nonradioactive method for detecting Hb Constant Spring gene. Lancet. 335 : 1527.

Fucharoen, S., Winichagoon, P., Potthakul, P., Piankijagum, A. and Wasi, P. 1988. Variable severity of Southeast Asian β^{o}–Thalassemia Hb E disease. Birth Defects. 23 : 241- 248.

Fucharoen, G., Fucharoen, S. P., Wanhakit, C. and Srithong, W. 1995. Molecular basis of α^{0}–Thalassemia in northeast Asian Southeast Asian J. Trop Med Public Health. 26 (Suppl 1) : 249-251.

Fukumaki, Y. and Fucharen Sp. 1991. Generation and spread of globin gene mutation in populatipn new aspects of the genetics of molecular evolution. Berlin Springer- Verlag 153-176.

Fucharoen, SP., Fucharoen, G. , Sae-ung, N., Sanchaisuriya, K. and Fukumaki, Y. 1997. Molecular and hematological Characterization of Hb Tak and Hb pyrgos in Thailand. Southeast Asian Journal of tropical Medicine and Public Health. 28 : (Suppl 3). 110-114.

Fucharoen, G., Fucharoen, SP., Jetsrisuparb, A., and Fukumaki. Y. 1990. Molecular basis of β-thalassemia and origin of Hb E in northeast . Thailand identification of one novel mutation using amplified DNA from blood specimens. Biochemical. and Biophysical Research. Communication. 170 : 698-704.

Fucharoen., Fucharoen, SP., wilai, Chinoluk, P., Supas,. K., and Sanchisuriya. K. 1997. Beta-Alpha globin gene haplotypes in some minor ethnic group in Thailand. Southeast Asian Journal of Tropial Medicine and Pubic Health. 23 (Suppl). 3 : 115-119.

Goossens, M., Dozy, Am., Embury, S.H., Zachariades, Z., Hadjiminas, G., M., Stamatoyannopoulos, G. and et al. 1980. Triplicated α–globin loci in human. Proc Natl Acad Sci USA 77 : 518.

Higgs, D.R., Wainscoat, J. S Flint, J. Hill, A.V. S., Thein, S. L., Nichells, R.d. and et al. 1986. Analysis of human α-globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus. Proc Natl Acad Sci. USA 83 : 5156-5169.

Higgs , Hill, A. V. S., Bowder, D. K., Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. 1984. Independent recombination events between the duplicated human α–globin gene: implication for their concerted evolution. Nucleic Acid Res. 12 : 6965-6977.

Hoffbrand A.V., Pettit, J.E. 1993. Erythropoiesis and general aspect of anemia. Blackwell Scientific Publication. 12-35.

Huang, Y., Wang, R., Zhang. N., Yang, X., Guo, X. Li, C. and et al. 1988. Genotypes of α–thalassemia in the Chinese. Birth Defects 23: 31-38.

Hundrieser. J., Deka, R., Gorger, B. C., Papp. T., and Flatz, G. 1988a. DNA haplotypes and frameworks associated with the beta-globin gene in the Kachari population of Assam (India). Hum Hered. 38 : 240-245.

Hundrieser ., Sanguansermsri, T., Papp, T., Laig, M. and Flatz, G. 1988b. β–globin gene linked DNA haplotypes and frameworks in three Southeast Asian population. Hum Genet. 80 : 90-94.

Hundrieser ., Sanguansermsi, T., Papp, T. and Flatz, G. 1988c. Alpha-thalassemia in Northern Thailand deletion types characterzed at the DNA level. Hum Hered. 38 : 211-215.

Ifedibs, T. C., Stern, A, Ibrahim, A. and Rieder, R. F. 1985. *Plasmodium falciparum* in Vitro : diminished growth in hemoglobin H disease erythrocytes. Blood. 65 : 452.

Ingrame, V.M. 1956. A specific chemical difference between the globin of normal human and Sickle-Cell anemia haemoglobin. Nature : 792-794.

Jin AL, M. A. T., Sin Hock, J. T. and Nilmani, S. 1995. Deletion Types of alpha Thalassemia in the Dravidian Indians of Singaphore. Southeast Asian J. Trop Med Public Health. 26 (Suppl 1) : 550-554.

Kazazian, H .H.Jr., Weber, P.G., Boechm, C.D., Lee, J. I., Antonarakis. S.E., and Fairbanks, V. F.,Fairbanks, V. F. 1984. Hemoglobin E in Europeans Further Evidence for multiple origins of the β^{E}– globin gene. Am J Hum Genet. 36 : 212-217.

Lauer, J., Shen C-K. J., and Maniatis T. 1980. The chromosomal arrangement of human α–like globin genes sequence homology and α-globin gene deletion. Cell. 20 : 119-130.

Lawn, RM., Epstratied, A. O., Cornell C., Maniatis. T. 1980. The nucleotide sequence of the human β -globin gene. Cell. 21 : 647-651.

Lawn, RM., Fritsch, E. F., Parker, R.C., Blake, G. and Maniatis, T. 1978. The isolation and characterization of linked ζ - and β –globin gene from a cloned library of human DNA Cell . 30 : 439 – 445.

Liebhaber, S. A., and Kan, Y. W. 1981. Differentiation of the mRNA transcripts originating from the α1 and α2–genes in normals and α-thalassemics. J. Clin. Invest. 68 : 439-448.

Lau, Y. L., Chan, L. C., Chan, Y. Y. A., Yenng, C. Y., Waye, J. S and Chui, D. H. 1997. Prevalence and genotypes of alpha-and beta-thalassemia carriers in Hong Kong implication for population screening. N. ENGL. J. Med . 336 : 1298-1301.

Lemmens-zygulska, M., Eigel, A., and Helbig, B. 1996. Prevalence of alpha-thalassemia in Northem Thailand. Hum Genet. 98 : 345-347.

Nakatsuji, T., Kutlar, F. and Huisman, T. H. J.. 1986. Haplotypes among Vietnamese hemoglobin E homozygotes including one with β–globin gene triplication Am.J Hum genet. 38 : 981-983.

Na-Nakorn, S., Wasi, P., Pornpatkul, M. and Pornpatkul, S. 1969. Further evidence for a genetic basis of haemoglobin H disease from newborn offspring of patients. Nature. 223 : 59.

Na-Nakorn ., 1978. The distribution of Hb E ; Hb E triangle in Southeast Asia . J Med ASS. Thai. 61 : 65.

Nicholls, R.D., Fischel-Ghodsian, N., and Higgs, D. R. 1987. Recombination at the human globin gene cluster sequence features and topological constraints. Cell. 49 : 369-378.

Novelletto, A., Hafez, M., Rienzo, A. D., Felicetti, L., Deidda, G. and et al. 1989. Frequency and molecular types of deletional α–thalassemia in Egypt. Human Genetics. 81 : 211-213.

Orkin, S. H. and Goff, S.C., The duplicated human α-globin gene their relative expression as measured by RNA analysis. Cell. 24 : 345-349.

Oppenheimer, S. J., Higgs, D. R., Weatherall, D. J., Barker, J. and Spark, R. A. 1984. Thalassemia in Papau New Guinea. Lancet. 52: 424-426.

Orkin. S. H, Old, J., Lazarus, H., Altay, C., Gurgey, A., Weatherall, D. J. and Nath, D. G. 1979. The molecular basis of α–thalassemia frequent occurrence of dysfunctional α–loci among non-Asian with Hb H disease. Cell. 17 : 39.

Orkin. S. H ., Kazazian, H. H. Jr., Antonarakis, S. E., Ostear, H., Goff, S.C., Sexton, T. P 1982. Abnormal mRNA processing due to the exon mutation of β^E–globin gene. Nature. 300 : 768-769.

Orkin, S. H. Kazazian, H .H.Jr., Antonarakis. S.E., and Goff, S. C. 1982. Linkage of β-thalassemia mutation and β-globin gene polymorphism with DNA polymorphisms in human β–globin gene cluster. Nature. 296 : 627-631.

Perutz, M. 1993. Hemoglobin structure. Philadelphaia. 24 : 13-35.

Sriboonlue, P. Vitoon prasongwatana, Jiraporn Prasongwatana., Nareit Mularlee, Pattara Sanchisuriya, Samart Moonamard et al. 1985. Hb E in Pootai and So tribes. J. Med. Ass. Thailand. 68 : 330-332.

Winichagoon, P., Fucharoan., P., Wilairat P. and Yasuyuki Fukumaki. 1995. Molecular mechanism of thalassmia in Southeast-Asia. Southeast Asian. Journal of Tropical Medicine and Public Health. 26 : (Supp l.) 35-239.

Pembrey, M.E., Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Bunch, C. and Perrine, D. J. 1975. Haemoglobin Bart's in Saudi Arabia. Brithsh Jounal of Haematology. 29 : 221-234.

Saiki, R. K., Gelfand, D. M., Stoffel, S. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science. 239 : 487-494.

Sanchisuriya, K. Fucharoen, G., Sae-ung, N., , Baisungnon, R., Jetsrisuparb, A. and et al. 1997. Molecular and hematological characterization of Hb E heterozygote with α–Thalassemia determinant. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 28 Suppl. 3 : 100-103.

Seidenfaden, E. 1952. The Kui people of Cambodia and Siam. Journal of the Siam Society. 39 : 144 – 180.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragment Separated by gel electrophoresis. J.Mol. Biol. 98 : 503-517.

Sriboonlue, P. ,et al. 1985. Hemoglobin E frequencies of Pootai and SO tribes Northeast Thailand . J. Med Ass Thailand. 68 : 330-332.

Stephen, H., and Judy, A. 1980. Two different Molecular organizations Account for the Single- globin gene of the thalassemia genotype. The American Society for clinical Investigation. 66 : 1319-1325.

Tanphaichitc, V. S and Pungamaritt P. 1988. Studies of hemoglobin Bart's and deletion of alpha globin gene from cord blood in Thailand. Birth Defects. 23 (5A) : 15- 21.

Tatis, B., Koula, S., Constantine. 1976. Hemoglobin pyrgos $\alpha 2\beta 2^{53Gly \rightarrow Asp}$. A new hemoglobin variant in double heterozygosity with hemoglobin S. Blood. 47 : 827-832.

Trcnt, R, J., Higgs,D.R.,Clegg, J.B., and Weatherall, D. J., 1981. A new triplicated α– globin gene arrangment in man. Bristish Jounal of Haematology. 49 : 149-152.

Tsinsof, A. S., Hertzberg, M. S., Prior, J. F., Mickleson, P. N. and Trent, R. J. 1990. α-globin gene marker identify genetic differences between Australian Aborigines and Melanesians. Am. J Hum. Genet. 46 : 138-143.

Wasi, P. Na-Nakorn, S., Suingdumrong, A. 1967. Studies of the distribution of hemoglobin E, thalassemia and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in North-Eastern Thailand. Nature. 214 : 501-502.

Whipple, G.H., Bradford, W. L. 1932. Mediterranean disease-thalassemia (erythro blastic anemia of cooley) associated pigment abnormalitics simulating hemochromatosis. J. Pediator. 9 : 154-158

Winichagoon P., Higgs, DR., Goodbourn, Winichagoon, P., Fucharoan., P., Wilairat P. and Yasuyuki Fukumaki. 1995. Molecular mechanism of thalassemia in Southeast-Asia. Southeast Asian. Journal of Tropical Medicine and Public Health. 26: Supple1. 235-239.

Winichagoon P . , D. R., Goodbourn, S. E. Y., Clegg, J. B., Weatherall, D. J. et al. 1984. The molecular basis of α– thalssemia in Thailand. EMBO J. 3 : 1813-1818.

Yenchitsomanus, P., Kim, M., Kuldeep, K., Jacqueline and Philip, G. 1985. Extremely high frequencies of α–globin gene deletion in Madang and on Kar Kar Island. Papau New Guinea. Am J Hum Genet. 37 : 778-784.

Yenchitsomanus, P., Summer, K.M., Board, PG. Bhatia, K.K., Jones, GL., Johnstons.K et al. 1986. Alpha-thalassemia in Papua New Guinea. Hum Genet. 74 : 432-437.

Yongvanit, P., Sribonlue, P., Mularlee, N., Kamthong, T., Areejitranusorn, P.,Hundreieser, J. et al. 1989. DNA haplotypes and frameworks linked to the β –globin locus in an Austro-Asiatic population with a high prevalence of hemoglobin E. Human Genetics. 83 : 171-174.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียมอุปกรณ์

หลอดทดลองทุกขนาด ขวดใส่น้ำยา ทิปปิเปต เครื่องแก้ว ตลอดจนอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในการทดลองต้องทำให้ปลอด nuclease ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที สำหรับอุปกรณ์ก่อนการทำ Southern blot ทุกครั้งจะต้องล้างให้สะอาด และสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

การเตรียมสารเคมี

1. 0.85 NaCl

   วิธีเตรียม : ละลาย sodium chloride 8.5 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. เมื่อละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Tris - EDTA - borate buffer

   วิธีเตรียม : ละลาย Tris base 10.2 กรัม EDTA 0.6 กรัม boric acid 0.32 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับ pH เป็น 8.6 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล.

3. Ponceau S (0.5 % W/V)

   วิธีเตรียม : ละลาย Ponceau S 0.5 กรัม และ Trichloroacetic acid 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 80 มล. ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตร 100 มล.

4. destaining solution

   ประกอบด้วย : 5% acetic acid

5. clearing solution

   ประกอบด้วย : methanol : glacial acetic acid = 4:1

6. 3 % dextran

   วิธีเตรียม : ละลาย dextran 30 กรัม และ sodium chlorid 9 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. ปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. lysis buffer pH 7.4

วิธีเตรียม : ละลาย ammonium chloride 6.63 กรัม, potassium carbonate 0.80 กรัม,500 mM และ EDTA 16 มล. ในน้ำกลั่นประมาณ 700 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ปรับปริมาตร ด้วยน้ำลั่นจนครบ 800 มล. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. SE buffer

วิธีเตรียม : ละลาย Na_2EDTA 9.306 กรัม และ sodium chloride 4.383 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ให้ได้ 7.8 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มล.

9. 20% SDS

วิธีเตรียม : ละลาย sodium dodecyl sulphate (SDS) 20 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. Pronase E

วิธีเตรียม : ละลาย Pronase E 10 มล. ในน้ำกลั่น 1 มล. เก็บที่ - 20 °C

11. Saturated sodium chloride

วิธีเตรียม : ละลาย sodium chloride 350.66 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มล. นำไปทำให้ปลอดเชื้อ (autoclave) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

12. 10X Taq buffer จะมาพร้อมกับ Taq polymerase ที่ซื้อจากบริษัทต่างๆ

13. TE buffer

ประกอบด้วย : 10 mM Tris acetate
1 mM EDTA

14. Gel loading buffer (6x)

ประกอบด้วย : 5% bromophenol
0.25% Xylene cyanol
30 % Glycerol in water

15. Ethidium bromide (0.5 มก./ มล.)

วิธีเตรียม : ใส่สารละลาย ethidium bromide (0.5 มก./ มล.) 20 มล. ลงในน้ำกลั่นประมาณ 200 มล.ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

16. 20 X SSC

ประกอบด้วย : 3 M NaCl

0.3 M Tris sodium citrate pH 7.0

17. Alkaline denaturation solution

วิธีเตรียม : ละลาย NaOH 20 กรัม NaCl 87.66 กรัม จนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล.

18. Neutralizing buffer

วิธีเตรียม : ละลาย Tris – base 60.55 กรัม และ NaCl 175.32 กรัม จนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล.

19. Partial depurination

วิธีเตรียม : เติม HCl 11 มล. ในน้ำกลั่น 500 มล.

20. Prehybridization buffer ปริมาตร 40 มล

วิธีเตรียม : เติม 20X SSC (autoclave)10 มล., 10 % N – Laurylsarcosine 0.4 มล. 10 % SDS 0.08 มล. และ Blocking powder 0.4 กรัม จากนั้นเติม ddH_2O จนครบ 40 มล.

21. Washing 1 (2 X SSC + 0.1 % SDS) ปริมาตร 500 มล.

วิธีเตรียม : เติม 20 X SSC 50 มล.และ 20 % SDS 2.5 มล. จากนั้นเติม ddH_2O จนครบ 500 มล.

22. Washing 2 (0.5 X SSC + 0.1 % SDS) ปริมาตร 500 มล.

วิธีเตรียม : เติม 20 X SSC 12.5 มล.และ 20 % SDS 2.5 มล. จากนั้นเติม ddH_2O จนครบ 500 มล.

23. Buffer 1 (100 mM Tris + 150 mM NaCl , pH 7.5) ปริมาตร 1000 มล.

วิธีเตรียม : เติม 1 M Tris, pH 7.5 100 มล. และ 5 M NaCl 30 มล. จากนั้นเติม ddH_2O จนครบ 1000 มล.

24. Buffer 2 (0.5 % Blocking powder in buffer 1) 50 มล.

วิธีเตรียม : เติม Blocking powder 0.25 กรัม.ใน buffer 1 50 มล. นำไปละลายที่อุณหภูมิ 65 °C

25. Buffer 3 (TE buffer, pH 9.5 $MgCl_2$) ปริมาตร 1000 มล.

วิธีเตรียม : เติม Tris – Base 12.11 กรัม, NaCl 5.86 กรัม และ $MgCl_2$ 50 มล. ใน ddH_2O 800 มล.ปรับ pH ให้เป็น 9.5 จากนั้นเติม ddH_2O จนครบ 1000 มล. นำไป autoclave ก่อนใช้

26. Buffer 4 (10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 1000 มล.

วิธีเตรียม : เติม 1M Tris pH 8.0 10 มล.และ 0.5 M EDTA 2 มล. ใน ddH_2O 800 มล. จากนั้นเติม ddH_2O จนครบ 1000 มล. นำไป autoclave ก่อนใช้

27. Color solution

วิธีเตรียม : เติม NBT (vial 10) 50 µl X – PO_4(vial 10) 50 µl ใน Buffer3 15 มล.

28. Antibody solution

วิธีเตรียม : เติม Dig - Ab(vial 8) 4 µl ใน Buffer 2 20 มล.

ขั้นตอนการเตรียม DNA Probe

1. เลี้ยงเชื้อ YF 203 ซึ่งมีโคลนของ α - globin gene ในอาหารเหลว BHI broth แล้ว นำไปบ่มที่ 37 °C ข้ามคืน
2. นำเชื้อที่เพิ่มจำนวนได้ถ่ายลงใน microtube ขนาด 1.5 มล. นำไปปั่นที่ 8,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดเอา supernatant ออกให้หมด
3. เติมสารละลาย TEG solution 80 µl ผสมด้วย Vortex จนตะกอนหลุดออกจากก้นหลอด
4. เติม lysozyme solution (10µg/µl) 20µl ผสมเบาๆ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
5. เติม 0.2 N NaOH / 1 % SDS 200 µl แล้วผสมโดยการกลับหลอดไปมา 2 - 3 ครั้ง จากนั้นตั้งบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
6. เติม 5 M KOAc 150 µl ผสมโดยกลับหลอดไปมา 2 - 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 5 นาที
7. นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาเฉพาะ suppernatant ใส่หลอดใหม่
8. เติม Phenol 150 µl และ $CHCl_3$ 150 µl เขย่านาน 5นาที ดูดเอา DNA solution ใส่หลอดใหม่
9. เติม NaOAc 1/10 เท่าของปริมาณ DNA solution
10. เติม 100 % ethanol ปริมาตร 2 เท่า ในปริมาณ DNA solution นำไปเก็บที่ -70 °C นาน 15 นาที

20. นำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ดูดเอา supernatant ทิ้งเสร็จแล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % ethanol ดูด 70 % ethanol ทิ้งให้หมด ทำให้ตะกอน plasmid DNA แห้งที่ อุณหภูมิ 37 °C ใน hot air oven
21. ละลาย plasmid DNA ที่แห้งแล้ว ใน TE - buffer 25 µl ที่มี RNase 1 µl (0.5 µg/ml) ผสมอยู่ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C นาน ประมาณ 15 - 30 นาที เพื่อลดปริมาณ RNA หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ 4°C

ขั้นตอนการตรวจสอบคุณสมบัติของ recombinant DNA ที่สกัดได้โดยการใช้เอนไซม์ *Pst* I

1. นำ recombinant DNA มาเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

Intacted plasmid YE 203	2 µl
10 X buffer	1 µl
H_2O	6 µl
100 mM spermidine	0.5 µl
เอนไซม์ *Pst* I (10 µl / ml)	0.5 µl

แล้วบ่มที่ 37 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง

2. นำไปตรวจสอบใน agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจหา α - globin gene clone เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Pst* I จะได้ ชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 2.7 Kb และ 1.5 Kb

ขั้นตอนการตัดและตกตะกอน recombinant DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ E*co*RI ก่อนนำไปเตรียมเป็น Probe

1. นำ recombinant DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ E*co*R I เติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

Intacted plasmid YE 203	30 µl
10X buffer for E*co*RI	10 µl
100 mM spermidin	1 µl
เอนไซม์ E*co*RI	1.5 µl
เอนไซม์ RNase (0.5 µg/µl)	5 µl
ddH_2O	52.5 µl

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน

2. ตรวจสอบคุณสมบัติของการตัด recombinant DNA โดย mini gel electrophoresis ถ้าตัดสมบูรณ์จะได้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 4.2 Kb เพียงชิ้นส่วนเดียว
3. ทำการตกตะกอน DNA โดยเติม 0.5 M EDTA 2 µl , ddH_2O 100 µl และเติม $CHCl_3$ 100 µl ผสมโดยการกลับหลอดไปมา นาน 5 นาที
4. นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูด supernatant ใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 มล.
5. เติม 3M NaOAc 2 µl และ เติม 100 % ethanol 440 ul นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 °C นาน 15 นาที
6. นำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที อีกครั้งหนึ่ง
7. ล้างด้วย 70 % ethanol ดูด 70 % ethanol ออกให้หมด
8. ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 37°C ใน hot air oven นาน 5 นาที
9. ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 16 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

ขั้นตอนการเตรียม α - globin gene probe

1. นำ DNA ที่ตกตะกอนแล้ว ที่ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 16 µl นำมาเพียง 5 µl เติม ddH_2O 5 µl
2. นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที หลังจากนั้น แช่ลงในน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที
3. เติม primer (vial 5) 2 µl, dNTP + dig (vial 6) 2 µl และ klenow enzyme (vial 7) 1 µl
4. เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 °C ข้ามคืน
5. หยุดปฏิกิริยา โดยการเติม 0.2 M EDTA 2 µl และ 4 LiCl 2 µl เก็บที่อุณหภูมิ -70 °C นาน 15 นาที
6. นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 20 นาที
7. ล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % ethanol ดูด 70 % ethanol ออกให้หมดทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นละลายด้วย TE - buffer เก็บไว้ที่ -20 °C

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ในตำแหน่งที่ 2 Gγ-*Hin*dIII โดยวิธี PCR ใช้โปรแกรม 7 และโปรแกรม 14 ที่อุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

94 °C	3 นาที	รอบแรก
94 °C	1 นาที	
55 °C	1 นาที	30 รอบ
77 °C	1 นาที	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ประยุกต์ ศรีวิไล เกิดวันที่ 14 กรกฎาคม พ.ศ. 2516 ตำบลอุ่มเม้า อำเภอโพนทอง จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เมื่อปีการศึกษา 2538 ศึกษาต่อหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 โดยรับทุน UDC ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม และ รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิต ในปี พ.ศ. 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย