การศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินและยีนแอลฟาโกลบิน ในชนกลุ่มไทพวน จังหวัดลพบุรี เลย และอุดรธานี

นางสาว อุรศรี สูยะศุนานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-061-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18578299

STUDIES OF BETA E-GLOBIN HAPLOTYPES AND ALPHA-GLOBIN GENE IN THAI-POUN POPULATIONS IN LOPBURI, LOEI AND UDON THANI PROVINCES

Miss Urasri Suyasunanont

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics
Department of Botany
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-333-061-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินและยีนแอลฟาโกลบินในชนกลุ่มไทพวน จังหวัดลพบุรี เลยและอุดรธานี
โดย	นางสาวอุรศรี สูยะศุนานนท์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์พรรณี ชิโนรักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์กุลนภา ฟู่เจริญ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์พรรณี ชิโนรักษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์กุลนภา ฟู่เจริญ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อุรศรี สูยะศุนานนท์ : การศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินและยีนแอลฟาโกลบินในชนกลุ่มไทพวน จังหวัดลพบุรี เลย และอุดรธานี (STUDIES OF BETA E-GLOBIN HAPLOTYPES AND ALPHA-GLOBIN GENE IN THAI-POUN POPULATIONS IN LOPBURI, LOEI AND UDON THANI PROVINCES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.พรรณี ชิโนรักษ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.กุลนภา ฟู่เจริญ , 96 หน้า. ISBN 974-333-061-5

การศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีเซลลูโลสอะซิเตดอิเลคโตรโฟเรซีส (TBE buffer, pH 8.9) ในประชากรชาวไทพวน 3 กลุ่มคือ ชาวไทพวนที่อาศัยอยู่บริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี จำนวน 89 ราย ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย จำนวน 74 ราย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี จำนวน 69 ราย พบอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 16.85% 41.85% และ 11.50% ตามลำดับ คิดเป็นความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินเท่ากับ 0.090 0.230 และ 0.065 ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบินด้วยวิธี PCR แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ตำแหน่งพบว่า ลักษณะแฮปโพลไทป์ 5 รูปแบบ รูปแบบที่พบมากที่สุดคือแบบ $-+-++\beta^{E}+-$ (43.33%) และ $+----\beta^{E}+-$ (40.00%) ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะ FW2 ทำให้เชื่อว่าชาวไทพวนเป็นประชากรที่มีชาติกำเนิดเดียวกันกับประชากรเชื้อชาติไทย-ลาว เช่น คนไทย ชาวผู้ไทย และลาวโซ่ง ส่วนอีก 3 รูปแบบคือ $-+--+\beta^{E}++$ $+----\beta^{E}-+$ และ $-+++-+\beta^{E}+-$ การศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินพบ 5′-haplotype แบบ +---- มากที่สุด (85.55%) สัมพันธ์กับลักษณะเฟรมเวิร์คทั้ง 3 รูปแบบ (FW3 , FW2 และ FW1) นอกจากนี้ยังพบ 5′-haplotype แบบ -+-++ -+++- ++-++ -+--+ และ ----+ อีกด้วย

การศึกษายีนแอลฟาโกลบินในชาวไทพวนทั้ง 3 กลุ่ม ด้วยวิธี Southern blot hybridization และ PCR พบยีนแอลฟาโกลบิน 4 รูปแบบ คือ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) Southeast Asian deletion (--SEA) และ triplicated α-globin ($\alpha\alpha\alpha$) มีความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.042 0.005 0.056 และ 0.005 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

4072471923 : MAJOR GENETICS
KEY WORD: THAI-POUN / BETA E-HAPLOTYPE / ALPHA-GLOBIN

STUDIES OF BETA E-GLOBIN HAPLOTYPES AND ALPHA-GLOBIN GENE IN THAI-POUN POPULATIONS IN LOPBURI, LOEI AND UDON THANI PROVINCES. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PUNNEE CHINORAK. THESIS COADVISER : ASSO. PROF. GOONNAPA FUCHAROEN. 96 pp. ISBN 974-333-061-5

Haemoglobin typing using cellulose acetate electrophoresis (TBE buffer, pH 8.6) in 3 Thai-poun populations; 89 , 74 and 69 individuals inhabited in Amphur Banmee Lopburi province, Amphur Cheingkan Loei province and Amphur Banphu Udonthani province were carried out. It was found that the incidences of HbE are 16.85% , 41.85% and 11.50%, respectively and β^E-globin gene frequencies are 0.090 , 0.230 and 0.065, respectively.

The β^E-globin gene haplotype was determined by PCR following by restriction endonuclease analysis at 7 polymorphic sites. The most common haplotypes are $-+-++\beta^E+-$ (43.33%) and $+----\beta^E+-$ (40.00%) which associated with FW2 similar to the previous studies in Thais, Phutai and Laos Song. The rest 3 types are $-+--+\beta^E++$ $+----\beta^E-+$ and $-++-+\beta^E+-$. The β^A-globin gene haplotype was also determined. The most common 5′-haplotype is +---- (85.55%) which associated with 3 frameworks (FW3 , FW2 and FW1).

Types and frequencies of α-globin gene using Southern blot hybridization and PCR were also examined in these Thai-poun populations. Four types of α-globin gene were found. Gene frequencies of rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$), leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$), Southeast Asian deletion (--SEA) and triplicated α-globin ($\alpha\alpha\alpha$) are 0.042, 0.005, 0.056 and 0.005, respectively.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่าน ดังนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์พรรณี ชิโนรักษ์ และรองศาสตราจารย์กุลนภา ฟู่เจริญ อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งได้ให้การดูแล ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นในการทำวิจัยมาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล ที่ได้ให้คำแนะนำแก้ไขข้อบกพร่อง ให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณ ฟู่เจริญ ผู้ช่วยศาสตราจารย์กนกวรรณ แสนไชยสุริยา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐยา แซ่อึ้ง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการทำวิจัย

ขอบพระคุณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยของแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อ วัสดุอุปกรณ์ และสถานที่ที่ใช้ทำวิจัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

อาสาสมัครชาวไทพวน และเจ้าหน้าที่สาธารณสุข ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี, ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างเลือด

ขอขอบคุณ คุณนันทวรรณ ชื่นชมคุณาธร คุณประยุกต์ ศรีวิไล คุณยุทธนา แพ็งแจ่ม และน้องทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

พี่ๆ นักศึกษาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุกคนที่ให้ที่พัก และให้การดูแลระหว่างการทำวิจัย

สุดท้ายกราบขอบพระคุณ คุณแม่ คุณพ่อ ที่สนับสนุนการศึกษา คณาจารย์ทุกท่านที่สั่งสมความรู้มาจนปัจจุบัน

และกราบแผ่นดินจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นเสมือนบ้านที่สองมานับสิบปี

สารบัญ

หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูปภาพ ..... ฌ
บทที่ 1. บทนำ 1
บทที่ 2. การตรวจสอบเอกสาร 3
บทที่ 3. สารเคมีและอุปกรณ์ 29
บทที่ 4. วิธีดำเนินการศึกษา 34
บทที่ 5. ผลการศึกษา 55
บทที่ 6. อภิปรายผลการศึกษา 77
บทที่ 7. สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 84
รายการอ้างอิง 87
ภาคผนวก 92
ประวัติผู้วิจัย 96

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงชนิด โครงสร้าง และปริมาณของฮีโมโกลบินในช่วงอายุต่าง ๆ ของคน ... 8
2. แสดงการกระจายของกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินในภูมิภาคต่าง ๆ ... 22
3. แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอ (Kb) ของยีนแอลฟาโกลบินที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Bgl*II และติดตามด้วย α-probe ... 26
4. ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์ค และดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินทั้ง 7 ตำแหน่ง ... 41
5. แสดงผลการศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน ... 57
6. แสดงผลการศึกษาลักษณะ FW ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน ... 62
7. แสดงผลการศึกษาลักษณะ FW ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน ... 63
8. แสดงผลการศึกษาลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน ... 70
9. แสดงผลการศึกษาลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน ... 71
10. แสดงผลการศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีนแอลฟาโกลบิน ... 76
11. แสดงผลการศึกษาความถี่อัลลีลของยีนแอลฟาโกลบิน ... 76

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. แสดงเส้นทางการอพยพ และที่ตั้งถิ่นฐานของชาวไทพวนในประเทศไทย 4
2. แสดงตำแหน่งที่ตั้งของกลุ่มประชากรไทพวนที่ทำการศึกษา 5
3. แสดงสมดุลของสายโกลบินที่ประกอบกันเป็นฮีโมโกลบินในคนปกติ ที่มีอายุมากกว่า 1 ปี 9
4. แสดงโครงสร้างของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน 12
5. แสดงโครงสร้างของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน ตำแหน่งโพลิมอร์ฟิสมทั้ง 7 ตำแหน่ง และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ศึกษา 14
6. แสดงยีนบีตาอีโกลบิน และตำแหน่งลำดับเบสที่ต่างกันในเฟรมเวิรค์ แต่ละแบบ 16
7. แสดงโครงสร้างของกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน 20
8. แสดงการเรียงตัวของ homology box X, Y และ Z ของยีนแอลฟาโกลบิน 21
9. แสดงกลไกการเกิด leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) ของยีนแอลฟาโกลบิน 21
10. แสดงกลไกการเกิด rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) ของยีนแอลฟาโกลบิน 21
11. แสดงโครงสร้างของยีนแอลฟาโกลบิน และการขาดหายไปชนิดที่ พบบ่อยในประเทศไทย 23
12. แสดงตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ BglII ภายในกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน 26
13. แสดง primer และตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการขาดหาย ไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (--SEA) ด้วยวิธี PCR 27
14. แสดงขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอนเอที่ต้องการโดยวิธี polymerase chain reaction 28
15. แสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด 35
16. แสดงที่ตั้งของกลุ่มประชากรไทพวนที่ทำการศึกษาทั้ง 3 กลุ่ม 36
17. แสดงโครงสร้างของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน, ตำแหน่งตัดจำเพาะทั้ง 7 ตำแหน่ง ชนิดของไพรเมอร์ และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ศึกษาดีเอนเอ แฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน 40
18. แสดงผลการศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis 57
19. แสดงผลการศึกษายีนบีตาอีโกลบินที่ตำแหน่ง β-*Ava*II 60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

20. แสดงผลการศึกษายีนบีตาอีโกลบินที่ตำแหน่ง 3'β-*Bam*HI 61
21. แสดงผลการศึกษายีนบีตาอีโกลบินที่ตำแหน่ง 5'ε-*Hind*III 65
22. แสดงผลการศึกษายีนบีตาอีโกลบินที่ตำแหน่ง ^{G}γ-*Hind*III 66
23. แสดงผลการศึกษายีนบีตาอีโกลบินที่ตำแหน่ง ^{A}γ-*Hind*III 67
24. แสดงผลการศึกษายีนบีตาอีโกลบินที่ตำแหน่ง ψβ-*Hinc*II 68
25. แสดงผลการศึกษายีนบีตาอีโกลบินที่ตำแหน่ง 3'ψβ-*Hinc*II 69
26. แสดงผลการศึกษายีนแอลฟาโกลบินด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 73
27. แสดงผลการศึกษายีนแอลฟาโกลบินด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II 74
28. แสดงผลการศึกษายีนแอลฟาโกลบินด้วยวิธี PCR 75

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชียอาคเนย์ที่ประกอบไปด้วยประชากรต่างๆ หลายเชื้อชาติ ที่มีภาษา และวัฒนธรรมแตกต่างกัน แต่เดิมการศึกษาลักษณะโครงสร้างของประชากร และความสัมพันธ์ระหว่างประชากรกลุ่มต่างๆ เหล่านี้ มักใช้หลักฐานทางประวัติศาสตร์ โบราณคดี อารยธรรม และภาษา ต่อมาได้มีความพยายามนำเอาหลักฐานทางชีววิทยามาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ของประชากร จึงได้มีการศึกษาถึงความถี่ยีนชนิดต่างๆ ในแต่ละกลุ่มประชากร การหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ได้ถูกนำมาใช้ในการสร้างสมมติฐานความสัมพันธ์ระหว่างประชากร จนกระทั่งการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลได้ถูกพัฒนา และพบลักษณะโพลิมอร์ฟิสมในระดับดีเอนเอของยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene) ซึ่งก่อนหน้านั้นได้มีการศึกษาถึงโครงสร้างและลำดับเบสเอาไว้อย่างละเอียด Antonarakis และคณะ (1982a) ได้เริ่มทำการศึกษารูปแบบของลักษณะโพลิมอร์ฟิสมที่พบในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน และเรียกรูปแบบของลักษณะโพลิมอร์ฟิสมที่พบบนโครโมโซมแต่ละแห่งว่า "แฮปโพลไทป์" เป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาพันธุศาสตร์ของประชากรโดยใช้ลักษณะแฮปโพลไทป์ ทำให้ต่อมามีการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในแต่ละประชากรกันอย่างกว้างขวาง โดยส่วนใหญ่นิยมศึกษาในยีนบีตาโกลบินและอัลลีลที่เกิดจากมิวเตชัน (mutation) ของยีนบีตาโกลบินเช่น ยีนบีตาธาลัสซีเมีย (β-thalassemia gene) ยีนบีตาเอสโกลบิน (β^S-globin gene) และยีนบีตาอีโกลบิน (β^E-globin gene) รวมไปถึงกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin gene) ซึ่งเป็นยีนที่มีการทำงานร่วมกับกลุ่มยีนบีตาโกลบินในการสร้างฮีโมโกลบินที่เป็นโปรตีนหลักในเม็ดเลือดแดง ลักษณะที่พบในยีนแอลฟาโกลบินนี้ เชื่อว่ามีอิทธิพลในการคัดเลือกตามธรรมชาติที่มีต่อโรคมาลาเรียเช่นเดียวกับความผิดปกติที่พบเนื่องจากอัลลีลของยีนบีตาอีโกลบิน

สำหรับในประเทศไทยในปี ค.ศ.1965 Flatz, Pik และ Sringam ได้เริ่มทำการศึกษาการกระจายของฮีโมโกลบินอี (haemoglobin E ; HbE) ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนบีตาอีโกลบิน และเป็นอัลลีลหนึ่งของยีนบีตาโกลบินที่มีการกระจายอยู่ทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในประชากรกลุ่มต่างๆ ของไทย เนื่องจากฮีโมโกลบินอีเป็นความผิดปกติที่ทำให้เกิดปัญหาสุขภาพของประชากร รวมทั้งมีอิทธิพลต่อการคัดเลือกตามธรรมชาติของการระบาดของโรคมาลาเรีย จึงทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับการกระจายความถี่อัลลีลในแต่ละ

ภูมิภาค รวมทั้งการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินที่พบในกลุ่มชนเชื้อชาติต่าง ๆ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน ควบคู่ไปกับการศึกษารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบิน ในชนกลุ่มไทพวน 3 กลุ่มที่อาศัยอยู่บริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี ชาวไทพวนเหล่านี้เชื่อว่าเป็นกลุ่มไทพวนที่มีการอพยพมาจากฝั่งซ้ายของแม่น้ำโขง ทางตอนเหนือของประเทศลาวในปัจจุบัน เข้ามาในประเทศไทยเมื่อประมาณตอนต้นของกรุงรัตนโกสินทร์ ยังไม่มีการศึกษาลักษณะพันธุกรรมทั้งสองแบบในกลุ่มประชากรดังกล่าวมาก่อน โดยจะทำการศึกษาการกระจายความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินด้วยการตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis ศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินด้วยวิธี restriction enzyme analysis โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด ที่ตำแหน่งโพลิมอร์ฟิสม 7 ตำแหน่งได้แก่ (1) ตำแหน่ง 5′ε-globin *Hinc*II (2) ตำแหน่ง Gγ-globin *Hind*III (3) ตำแหน่ง Aγ-globin *Hind*III (4)ตำแหน่ง ψβ-globin *Hinc*II (5) ตำแหน่ง 3′ψβ-globin *Hinc*II (6) ตำแหน่ง β-globin *Ava*II และ (7) ตำแหน่ง 3′β-globin *BamH*I และศึกษารูปแบบของกลุ่มยีนแอลฟา โกลบินด้วยวิธี Southern blot hybridization และ polymerase chain reaction (PCR)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการกระจายความถี่ และลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน ตลอดจนศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินของชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน และลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน ตลอดจนทราบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน เพื่อบอกถึงต้นกำเนิดหรือความสัมพันธ์ของกลุ่มชาติพันธุ์ในประชากรไทพวนทั้งสามกลุ่มที่ทำการศึกษา

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ไทพวน

พวนเป็นชื่อเรียกชาวไทยกลุ่มหนึ่งที่มีถิ่นเดิมอยู่ที่เมืองพวน แขวงเมืองเชียงขวาง หรือจังหวัดตรันนินตามภาษาญวน (เวียดนาม) ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว จัดเป็นประชากรที่อยู่ในกลุ่มไทย-ลาว หรือไท-กะได ใช้ภาษาพวน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มภาษาตระกูลไท หรือ ไต (Thai or Tai languages family) ซึ่งเป็นภาษาที่ใช้แพร่กระจายอยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ภาษาไทย และภาษาลาวเป็นต้น ชาวพวนมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น ภาคอีสานมักจะเรียกว่า ไทยพวน ทางภาคกลางจะเรียกลาวพวน และบางครั้งอาจเรียกไทพวน ซึ่งคำว่าไทในที่นี้จะหมายถึงชนชาติที่อยู่หรือเคยอยู่นอกประเทศไทย และใช้ภาษาในตระกูลไท

ชาวไทพวนมีภาษาพูด วัฒนธรรม และประเพณีเป็นของตนเอง นับถือพุทธศาสนา แต่ในบางพื้นที่ยังมีประเพณีการถือผีอยู่บ้าง เช่น ผีปู่ตา ผีฟ้าพญาแถน เป็นต้น สังคมของชาวไทพวนในปัจจุบันส่วนใหญ่ยังเป็นสังคมแบบชนบท ยังชีพด้วยการทำไร่ ทำนา เลี้ยงสัตว์ และทอผ้า ชาวไทพวนได้รับการยกย่องว่าเป็นผู้มีรูปร่างหน้าตาหมดจด กิริยาละเมียดละไม ขยันขันแข็งในการทำงาน และเป็นกลุ่มชนที่รักสงบ ไม่ชอบการรุกรานหรือสงคราม ในประวัติศาสตร์จึงปรากฏว่าชาวไทพวนถูกปกครองจากหลายฝ่าย เช่น ขึ้นกับญวนบ้าง เวียงจันทร์บ้าง ในตอนต้นของกรุงรัตนโกสินทร์ช่วงรัชสมัยสมเด็จพระพุธยอดฟ้าจุฬาโลกมหาราช (รัชกาลที่ 1) จนถึงรัชสมัยสมเด็จพระนั่งเกล้าเจ้าอยู่หัว (รัชกาลที่ 3) ได้เกิดสงครามขึ้นหลายครั้ง (โพธิ์ แซมลำเจียก, 2537) ทั้งระหว่างชาวไทยกับชาวญวน ชาวญวนกับเชียงขวาง และ ลาวเวียงจันทร์กับลาวหลวงพระบาง ทำให้ชาวพวนที่อพยพเข้ามาในประเทศไทยมีทั้งชาวพวนที่ถูกกวาดต้อนมาเป็นเชลยศึก บ้างก็ถูกส่งมาเป็นบรรณาการต่อพระมหากษัตริย์ของไทย และมีบางส่วนที่อพยพเข้ามาเนื่องจากหนีภัยสงครามพร้อมกับชาวไทสาขาอื่นซึ่งตั้งถิ่นฐานอยู่ใกล้เคียงกัน เช่น ผู้ไท และลาวโซ่ง (วิเชียร วงศ์วิเศษ, 2525) ทำให้มีชาวพวนที่ย้ายถิ่นฐานเข้ามาในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยกระจายอยู่ตามจังหวัดต่าง ๆ ส่วนใหญ่อยู่บริเวณภาคกลาง

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน และภาคเหนือตอนล่าง รวมแล้วอาจมีจำนวนมากถึงเกือบ 250,000 คน ทั่วประเทศ (วีระพงศ์ มีสถาน, 2539)

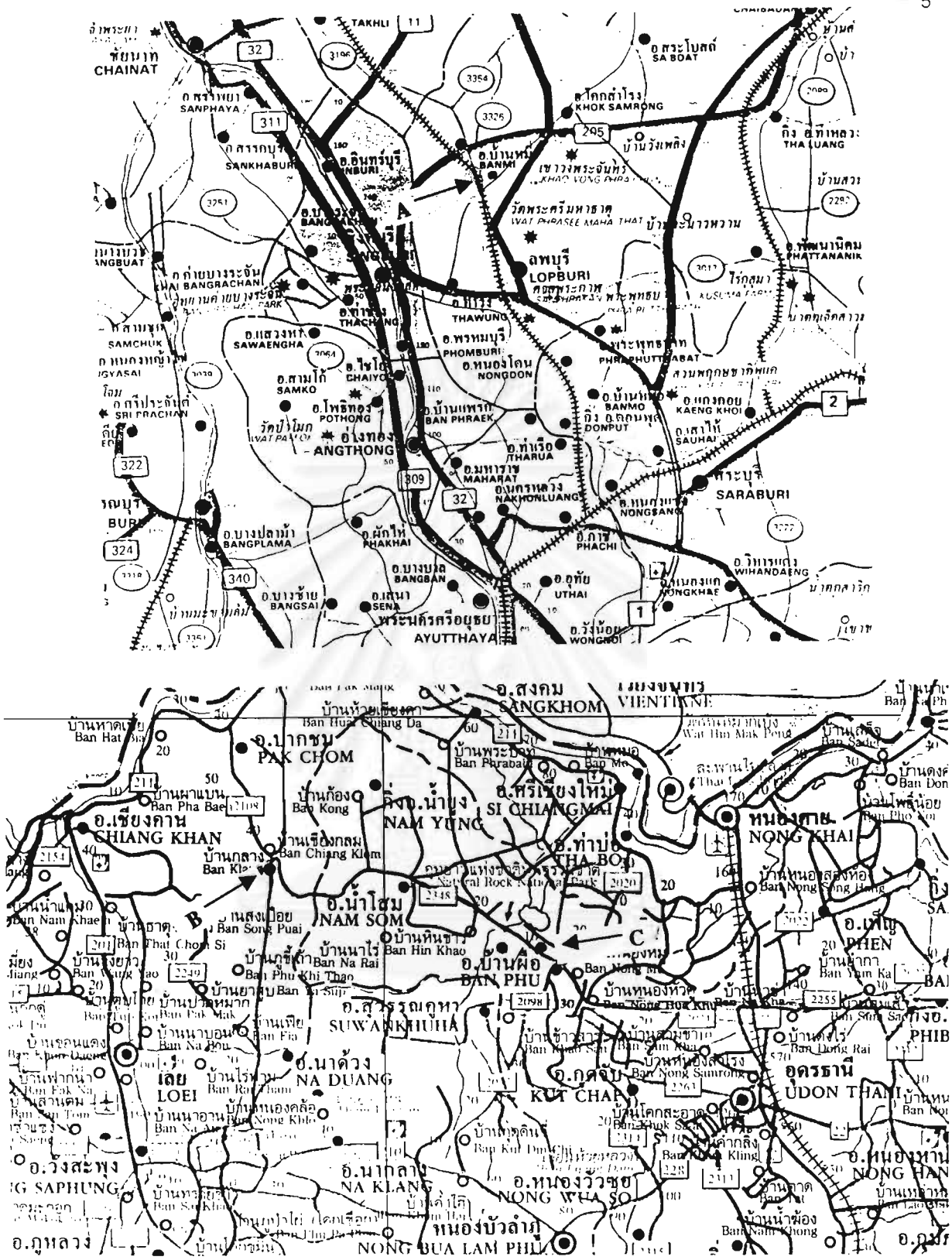
ในการศึกษาครั้งนี้เลือกทำการศึกษาชาวไทพวน 3 กลุ่ม คือ

1. ชาวไทพวนที่อาศัยอยู่บริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี
2. ชาวไทพวนที่อาศัยอยู่บริเวณ ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย
3. ชาวไทพวนที่อาศัยอยู่บริเวณ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

บริเวณ อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี เป็นบริเวณที่มีชาวไทพวนอาศัยอยู่มากที่สุดในประเทศไทย ส่วนใหญ่ถูกกวาดต้อนเข้ามาในประเทศไทยด้วยผลจากสงครามในสมัยรัชกาลที่ 3 ชาวไทพวนที่อาศัยอยู่บริเวณ อ.เชียงคาน จ.เลย เชื่อว่าเป็นชาวพวนที่อพยพจากภาคกลางกลับไปยังภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อให้ใกล้ถิ่นฐานเดิมของตนหลังจากที่พระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัวรัชกาลที่ 5 ทรงประกาศเลิกทาส ส่วนชาวไทพวนที่อาศัยอยู่บริเวณ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี เป็นชาวไทพวนที่หนีศึกฮ่อเข้ามาอยู่ในประเทศไทยในสมัยรัชกาลที่ 5 (ฤดีมน ปรีดีสนิท, 2539)

ภาพที่ 1 แสดงเส้นทางการอพยพ และที่ตั้งถิ่นฐานของชาวไทพวนในประเทศไทยโดยสังเขป (โพธิ์ แซมลำเจียก, 2537)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงที่ตั้ง และแผนที่ที่ตั้งของกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา ตามลูกศรชี้

A คือที่ตั้ง ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี B คือที่ตั้ง ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ C คือที่ตั้ง ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

การศึกษาประชากร

การศึกษาประชากรในเชิงสังคมศาสตร์ และประวัติศาสตร์มักนิยมใช้หลักฐานต่าง ๆ เช่น โบราณสถาน โบราณวัตถุ หลักฐานทางวัฒนธรรม สังคม และภาษา เป็นเครื่องมือในการศึกษาประวัติความเป็นมาของประชากรแต่ละกลุ่ม รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากร อย่างไรก็ตามนักวิชาการที่ทำการศึกษาประชากรอาจมิได้ตีความหลักฐานที่พบไปในทางเดียวกันเสมอไป แม้ว่าหลักฐานต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาจะสามารถบ่งถึงความสัมพันธ์ระหว่างอารยธรรมของประชากรได้ แต่มิได้หมายความจะสามารถบ่งถึงความสัมพันธ์ทางเชื้อสายหรือชาติพันธุ์ระหว่างประชากรได้อย่างถูกต้องเสมอไป จึงได้มีความพยายามนำเอาหลักฐานทางชีววิทยามาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประชากร โดยหลักการที่ใช้จะตั้งอยู่บนพื้นฐานของพันธุศาสตร์ประชากร ทั้งในระดับโปรตีน และระดับดีเอนเอ โดยตั้งสมมติฐานว่าประชากรที่มีความสัมพันธ์กันทางเชื้อสายน่าจะมีแนวโน้มโครงสร้างทางพันธุกรรมเป็นไปในทางเดียวกัน อย่างไรก็ตามจะต้องไม่ลืมอิทธิพลจากปัจจัยภายนอก เช่น สภาพแวดล้อมที่ทำให้เกิดการคัดเลือกประชากร การอพยพโยกย้ายประชากร และการแต่งงานข้ามกลุ่มประชากร เป็นต้น ดังนั้นยีนและอัลลีลต่าง ๆ จึงได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษา เพื่อบ่งถึงลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร และนำไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประชากรต่อไป (เสมอชัย พูลสุวรรณ, 2536)

ในปี พ.ศ. 2537 เสมอชัย พูลสุวรรณ ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยจัดแบ่งกลุ่มชาติพันธุ์ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มไทย-ลาว ได้แก่กลุ่มประชากรที่ใช้ภาษาตระกูลไท (2) กลุ่มออสโตรเอเชียติก (Austroasiatic) ได้แก่กลุ่มชาติพันธุ์เขมร จ.สุรินทร์ และกลุ่มชาติพันธุ์ที่ใช้ภาษาตระกูลมอญ-เขมร (3) กลุ่มจีน-ทิเบต (Chino-tibetian) ได้แก่ชาวเขาเผ่าต่าง ๆ ทางภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย และกลุ่มชนเชื้อสายจีนในประเทศไทย (4) กลุ่มออสโตรนีเซียน (Austronesian) ได้แก่ ชาวมุสลิมทางภาคใต้ พบว่าประชากรเชื้อสายไทย-ลาวจากทั่วทุกภาคของไทยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากในทางพันธุกรรมระหว่างพวกเดียวกันเอง และกับกลุ่มชาติพันธุ์เขมร แต่ห่างจากกลุ่มชาติพันธุ์จีน-ทิเบต และกลุ่มออสโตรนีเซียน การศึกษานี้ถือว่าเป็นแนวทางในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

การศึกษากลุ่มประชากรในครั้งนี้จะใช้ยีนในกลุ่มบีตาอีโกลบิน และยีนแอลฟาโกลบินเป็น genetic marker ในการศึกษาประชากร เนื่องจากยีนทั้งสองเป็นยีนที่ทำงานร่วมกันในการสร้างฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าความผิดปกติใดๆ ที่เกิดบนเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีอิทธิพลต่อการคัดเลือกตามธรรมชาติที่มีต่อการระบาดของโรคมาลาเรีย ซึ่งอธิบายได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะผิดปกติจะไม่เป็นเซลล์เป้าหมาย (target cell) ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ทำให้ผู้ที่มียีนผิดปกติสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย แม้ว่าส่วนใหญ่ยีนที่ผิดปกติเหล่านี้มักจะเป็น lethal recessive gene ทำให้ผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous เสียชีวิตเนื่องจากความผิดปกตินั้นๆ ก็ตาม แต่ผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous จะสามารถมีชีวิตอยู่ได้และไม่เป็นโรคมาลาเรีย สำหรับยีนบีตาอีโกลบินเป็นความผิดปกติที่มิได้รุนแรงจนถึงแก่ชีวิต จึงทำให้ยีนนี้สามารถคงอยู่ได้ในประชากร และแพร่กระจายได้ง่าย ดังจะเห็นได้ว่าในประชากรที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียจะพบอุบัติการของ HbE ค่อนข้างสูง (Flatz , Pik and Sringam, 1965) ส่วนยีนแอลฟาโกลบินเป็นยีนที่มีหลายอัลลีล ซึ่งอัลลีลที่ผิดปกติและอยู่ในสภาพ homozygous จะถูกคัดออกจากประชากร และในขณะเดียวกันก็รักษายีนในสภาพ heterozygous เอาไว้ (Higgs et al., 1989)

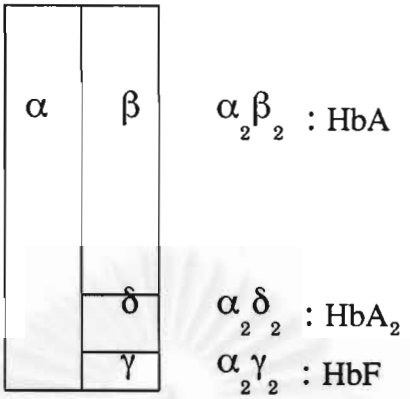
อย่างไรก็ตามการกล่าวอ้างถึง selective forces ที่มีผลกระทบต่อความถี่ของฮีโมโกลบินผิดปกติในการศึกษาเกี่ยวกับชาติพันธุ์วิทยา ความสัมพันธ์ทางเชื้อสาย และการอพยพของประชากรนั้นอาจมีข้อจำกัดบางประการ คือแม้จะเห็นได้ชัดว่ายีนที่เป็นประโยชน์จะสามารถแพร่กระจายได้ง่ายระหว่างประชากรที่มีความสัมพันธ์กันทั้งในด้านภาษา และวัฒนธรรม แต่สภาพทางภูมิศาสตร์ และกำแพงทางสังคมจะเป็นเครื่องขัดขวางการกระจายตัวของยีน ดังนั้นการสรุปถึงความสัมพันธ์ของประชากรจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยหลายอย่างประกอบกัน ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีประชากรเชื้อชาติต่างๆ มากมายที่มีความแตกต่างทางประเพณี วัฒนธรรม และรวมไปถึงความแตกต่างทางสภาพแวดล้อม จึงเป็นแหล่งที่เหมาะต่อการศึกษาเชื้อสายของชาติพันธุ์ นอกจากนี้ถึงแม้การอพยพของประชากรจะทำให้โครงสร้างของประชากรเปลี่ยนแปลงไป แต่ลักษณะทางพันธุกรรมดั้งเดิมที่ได้รับมาจากบรรพบุรุษก็จะยังคงอยู่ในประชากร และจะถ่ายทอดไปยังลูกหลานรุ่นต่อไป ทำให้การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรเป็นการศึกษามรดกทางเชื้อสายโดยตรง ที่มิได้ขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงทางวัฒนธรรม (เสมอชัย พูลสุวรรณ, 2537)

ฮีโมโกลบิน (haemoglobin)

ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนหลักในเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนจากปอดส่งไปยังอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็น quaternary structure ใน 1 โมเลกุลจะประกอบด้วยสายโปรตีนโกลบิน 4 สาย แต่ละสายจะจับอยู่กับฮีม (heme) 1 โมเลกุล โดยที่สายโกลบิน 2 สายจะเป็น β-like subunit ที่สังเคราะห์ได้จากยีนในกลุ่มบีตาโกลบิน (β-globin gene cluster) บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 11 และอีก 2 สายจะเป็น α-like subunit ที่สังเคราะห์ได้จากยีนในกลุ่มแอลฟาโกลบิน (α-globin gene cluster) บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 16 ยีนแต่ละยีนในกลุ่มบีตาโกลบิน และกลุ่มแอลฟาโกลบินมีการแสดงออกในระยะที่แตกต่างกัน จึงทำให้ในช่วงอายุต่างๆ ของคนมีชนิด และปริมาณของฮีโมโกลบินที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยในคนปกติที่มีอายุมากกว่า 1 ปีขึ้นไปจะมีการทำงานของยีน แอลฟาโกลบิน บีตาโกลบิน เดลตาโกลบิน และแกมมาโกลบิน ประกอบกันได้เป็น ฮีโมโกลบิน A (Hb A หรือ $\alpha_2\beta_2$) ประมาณ 96% ฮีโมโกลบิน A_2 (HbA_2 หรือ $\alpha_2\delta_2$) ประมาณ 3% และ ฮีโมโกลบิน F (HbF หรือ $\alpha_2\gamma_2$) น้อยกว่า 1% (ภาพที่ 3) (กุลนภา ฟู่เจริญ, 2533)

ตารางที่ 1 ชนิด โครงสร้าง และปริมาณของฮีโมโกลบินในช่วงอายุต่างๆ ของคน
(กุลนภา ฟู่เจริญ, 2533)

ชนิดของฮีโมโกลบิน	โครงสร้าง	ปริมาณ (%)			
		ทารกในครรภ์ 1-8 สัปดาห์ (embryo)	ทารกในครรภ์ (fetus)	ทารกแรกเกิด (new born)	อายุมากกว่า 1 ปี (adult)
Gower I	$\zeta_2\varepsilon_2$	40	-	-	-
Gower II	$\alpha_2\varepsilon_2$	25	-	-	-
Portland	$\zeta_2\gamma_2$	1-5	1-5	1	-
F	$\alpha_2\gamma_2$	30	90	50-80	< 1
A	$\alpha_2\beta_2$	5	10-20	15-40	96
A_2	$\alpha_2\delta_2$	-	-	0.5-1	3



ภาพที่ 3 แสดงสมดุลของสายโกลบินที่ประกอบกันเป็นฮีโมโกลบิน ในคนปกติที่มีอายุมากกว่า 1 ปี

ฮีโมโกลบินอี (haemoglobin E ; HbE) และยีนบีตาอีโกลบิน (β^E-globin gene)

ฮีโมโกลบินอีเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากยีนบีตาอีโกลบิน ซึ่งเป็นอัลลีลที่เกิดจากมิวเตชัน (mutation) ของยีนบีตาโกลบินที่ลำดับเบสในโคดอนที่ 26 จาก GAG กลายเป็น AAG ทำให้กรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) เปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ($\beta^{26GAG \rightarrow AAG\ :\ glu \rightarrow lys}$) ผลของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนนี้ ทำให้เกิดสายโกลบินผิดปกติที่เรียกว่าบีตาอีโกลบิน ซึ่งเมื่อรวมกับสายแอลฟาโกลบินจะทำให้เกิดเป็นฮีโมโกลบินที่เรียกว่าฮีโมโกลบินอี (haemoglobin E ; HbE) รวมทั้งก่อให้เกิด abnormal splicing ของ β^E-mRNA ทำให้เกิด cryptic splice site ที่บริเวณโคดอนที่ 24-27 ปริมาณการสังเคราะห์สายโกลบินก็จะลดลง (Winichagoon et al., 1995) ดังนั้นในผู้ที่มี จีโนไทป์เป็น heterozygous β^E/β^A จะตรวจพบปริมาณฮีโมโกลบินอีประมาณ 30% ของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด สำหรับในแง่การทำงานของฮีโมโกลบินอี แม้ฮีโมโกลบินอีจะเป็นฮีโมโกลบินที่ผิดปกติและไม่เสถียร แต่ก็ยังสามารถจับกับออกซิเจนได้ตามปกติ ดังนั้นในผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous β^E/β^A จะไม่พบความผิดปกติทางคลินิค ส่วนผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous β^E/β^E ซึ่งมีการสร้างเฉพาะ HbE แต่ไม่มีการสร้าง HbA จะมีขนาดเม็ดเลือดแดงเล็กกว่าปกติ และมีอาการซีดเล็กน้อย (Fucharoen Sp. et al., 1994)

การกระจายตัวของฮีโมโกลบินอี

ตั้งแต่ฮีโมโกลบินอีได้ถูกค้นพบโดย Na-Nakorn Minnich และ Chongcharoensuk ในปี ค.ศ. 1954 (อ้างถึงใน Flatz Pik และ Sringam, 1965) ได้มีการศึกษาการกระจายความถี่ของฮีโมโกลบินอีในบริเวณต่างๆ พบว่าฮีโมโกลบินอีมีการกระจายตัวอยู่ทั่วไปในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในความถี่ต่างๆ กัน โดยเฉพาะบริเวณรอยต่อของประเทศไทย ลาว และกัมพูชาพบความถี่ฮีโมโกลบินอีสูง จนได้รับการขนานนามว่า "HbE triangle" และความถี่ของฮีโมโกลบินอีจะลดลงเรื่อยๆ ตามระยะทางที่ห่างออกจากบริเวณดังกล่าว

Flatz et al. (1956) ศึกษาการกระจายของฮีโมโกลบินอี ในประชากรไทยจำนวน 2805 ราย พบความถี่ยีนฮีโมโกลบินอีในประชากรภาคกลางเท่ากับ 0.084 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่ากับ 0.250 และภาคเหนือเท่ากับ 0.046 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในกลุ่มชนเชื้อสายต่างๆ ที่อพยพเข้ามาในประเทศไทยก่อนหน้านั้นราว 50-100 ปี พบความถี่ยีนฮีโมโกลบินอีในประชากรชาวเขมร จ.สุรินทร์ เท่ากับ 0.327 ชาวมอญจากจังหวัดลำพูนเท่ากับ 0.067 ละว้าเท่ากับ 0.013 และผีตองเหลือง (Mrabri) เท่ากับ 0.167

Wasi Na-nakorn และ Suingdumrong (1967) สำรวจประชากร ทหาร ผู้ป่วย และนักโทษใน จังหวัดอุบลราชธานี ขอนแก่น และอุดรธานี พบความถี่ของฮีโมโกลบินอีเฉลี่ยเท่ากับ 0.420

พรรณี ชิโนรักษ์ และมุกดา คูหิรัญ (2532-2535) รายงานพบอุบัติการณ์ฮีโมโกลบินอีในภาคอีสานสูงถึง 30-40%

เสมอชัย พูลสุวรรณ (2536) รายงานความถี่ยีนฮีโมโกลบินอีในประชากรที่ใช้ภาษาตระกูลมอญ-เขมรซึ่งถือว่าเป็นชนชาติพื้นเมืองของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความแปรผันอยู่ในช่วง 0 ถึงมากกว่า 0.30 โดยพบความถี่สูง (มากกว่า 0.3) ในกลุ่มเขมรสูงจากทางตอนใต้ของประเทศลาว และบนที่ราบสูงตอนกลางของประเทศเวียดนาม แต่พบความถี่ค่อนข้างต่ำ (0-0.1) ในพวกเวียดนาม ขมุ และละว้า และได้เสนอว่าการกระจายความถี่ของยีนฮีโมโกลบินอีไม่ขึ้นต่อความสัมพันธ์ของกลุ่มชาติพันธุ์

เยาวลักษณ์ วิไล (2538) ศึกษาความถี่ยีนบีตาอีโกลบินในชาวชอง และซาไก พบความถี่เท่ากับ 0.589 และ 0.025 ตามลำดับ

Pravatmuang et al. (1995) ศึกษาอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินอีในภาคเหนือของประเทศไทย พบสูงถึง 25.05% สูงที่สุดในจังหวัดพิษณุโลก 38.89% สำหรับในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบอุบัติการณ์อยู่ในช่วง 11-60%

อุรศรี สูยะศุนานนท์ (2539) ศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินในชนกลุ่มไทพวน จังหวัดลพบุรี พบความถี่ยีนบีตาอีโกลบินเท่ากับ 0.129

Fucharoen G. et al. (1997) รายงานความถี่ยีนบีตาอีโกลบินในประชากรภาคเหนือเท่ากับ 0.05 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 0.15 ชาวเขา (ลิซอ มูเซอ ไทใหญ่ ม้ง กะเหรี่ยง และแม้ว) 0.01 ผู้ไท 0.31 ชอง 0.60 ลาวโซ่ง 0.05 และซาไก 0.06

ประยุกต์ ศรีวิไล (2541) รายงานความถี่ยีนฮีโมโกลบินอีในประชากรชาวกูย จังหวัดมหาสารคาม และสุรินทร์ เท่ากับ 0.367

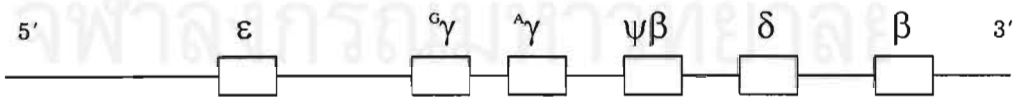
การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบิน

ดังที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้แล้วว่าในคนปกติที่มีอายุมากกว่าหนึ่งปีขึ้นไป จะมีฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน และฮีโมโกลบินเหล่านี้ก็จะมีประจุไฟฟ้าสุทธิแตกต่างกันด้วย คุณสมบัตินี้จึงทำให้สามารถตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบิน (haemoglobin typing) ได้โดยการแยกชนิดของฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้า (haemoglobin electrophoresis) โดยทั่วไปนิยมให้ฮีโมโกลบินวิ่งในสนามไฟฟ้าที่มี pH มากกว่า pI ของฮีโมโกลบิน คือ pH ประมาณ 8.6 ซึ่งจะทำให้ฮีโมโกลบินทุกชนิดมีประจุเป็นลบ ดังนั้นฮีโมโกลบินที่มีประจุลบมากกว่าก็จะวิ่งเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่าฮีโมโกลบินที่มีประจุลบน้อยกว่า (กุลนภา ฟู่เจริญ, 2539) ปัจจุบันการตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้าที่นิยมมีอยู่ 2 วิธี คือ starch gel electrophoresis และ cellulose acetate electrophoresis โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธี cellulose acetate electrophoresis เนื่องจากมีขั้นตอนที่สะดวก และรวดเร็วกว่า ด้วยวิธีนี้จะสามารถแยกฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในเม็ดเลือดแดงได้ โดยในคนปกติ ซึ่งมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็น β^A/β^A และจีโนไทป์ของยีนแอลฟาโกลบินเป็น $\alpha\alpha/\alpha\alpha$

จะพบฮีโมโกลบินได้ 3 ชนิด ซึ่ง HbA มีปริมาณมากที่สุด วิ่งเข้าหาขั้วบวกได้เร็วที่สุด HbF จะวิ่งเข้าหาขั้วบวกได้ช้ากว่า HbA เล็กน้อย แต่เนื่องจากมีปริมาณน้อยมากจึงมองไม่เห็น ส่วน HbA_2 จะวิ่งเข้าหาขั้วบวกได้ช้าที่สุดในกลุ่มที่กล่าวมา สำหรับคนที่มีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็น β^E/β^A จะมีการสร้าง ทั้ง HbA และ HbE โดย HbE จะถูกสร้างขึ้นประมาณ 30% และวิ่งในตำแหน่งเดียวกันกับ HbA_2 แต่เนื่องจากในคนปกติ HbA_2 จะถูกสร้างขึ้นเพียงประมาณ 3% ของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด จึงสามารถจำแนกชนิดได้จากความเข้มของแถบฮีโมโกลบินที่มองเห็น ด้วยวิธีนี้จะอ่านชนิดของของฮีโมโกลบิน (haemoglobin typing) ของคนปกติเป็น A_2A คนที่มีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็น β^E/β^A อ่านได้เป็น EA และคนที่มีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็น β^E/β^E อ่านได้เป็น EE

กลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene cluster)

กลุ่มยีนบีตาโกลบินหรือบีตาเอโกลบิน (β^A-globin gene cluster) เป็นกลุ่มยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 11 (11p15) มีความยาวประมาณ 68.1 Kb (Chakravarti et al., 1984) ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 6 ยีน มีตำแหน่งเรียงจากปลายด้าน 5′ ไปด้าน 3′ คือ ยีนเอฟซีลอนโกลบิน (ε-globin gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์สายเอฟซีลอนโกลบิน ยีนจีแกมมาโกลบิน ($^G\gamma$-globin gene) และ เอแกมมาโกลบิน ($^A\gamma$-globin gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์สายแกมมาโกลบินที่มีลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 136 เป็นไกลซีน (glycine) และอลานีน (alanine) ตามลำดับ ยีนเทียมบีตาโกลบิน (ψβ-globin gene) ยีนเดลตาโกลบิน (δ-globin gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์สายเดลตาโกลบิน และ ยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene) ทำหน้าที่สังเคราะห์สายบีตาโกลบิน ตามลำดับ (ภาพที่ 4) แต่ละยีนมีโครงสร้างเป็น 3 exon และ 2 intervening sequence (IVS) สายโปรตีนโกลบินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยยีนในกลุ่มนี้จะเป็นสายโกลบินในกลุ่ม β-like subunit มีความยาว 146 กรดอะมิโน ทำงานร่วมกับสายโกลบินที่สังเคราะห์จากยีนในกลุ่มแอลฟาโกลบินประกอบกันเป็นฮีโมโกลบิน



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน

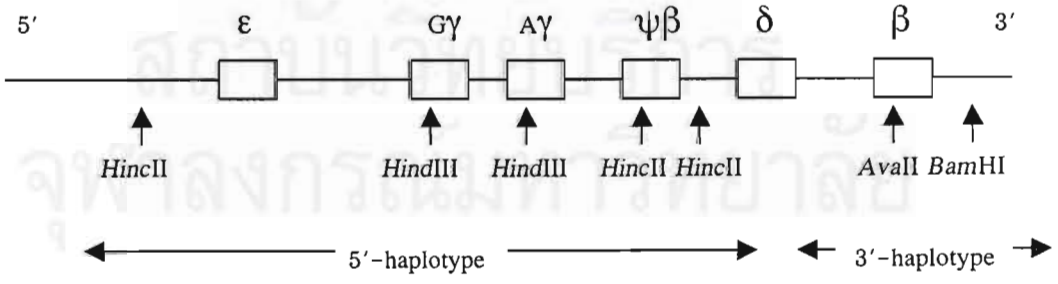
เนื่องจากในช่วงแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล กลุ่มยีนบีตาโกลบินเป็นกลุ่มยีนที่คณะวิจัยต่าง ๆ ให้ความสนใจเป็นอย่างมาก จึงทำให้มีข้อมูลพื้นฐานของยีนในกลุ่มนี้อย่างละเอียด ทั้งตำแหน่ง โครงสร้าง และการทำงานของยีน พบว่ายีนในกลุ่มบีตาโกลบินเป็นยีนที่มีความหลากหลายในประชากรค่อนข้างสูง พบอัลลีลที่เกิดจากมิวเตชันและลักษณะโพลิมอร์ฟิสมในรูปแบบต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก ดังนั้นยีนกลุ่มนี้จึงเป็นยีนที่นักวิจัยหลายคณะนิยมใช้เป็น genetic marker สำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร โดยพบว่ามีบางอัลลีลที่มีความสำคัญในการศึกษาวิวัฒนาการของกลุ่มชาติพันธุ์ คือ ยีนบีตาเอสโกลบิน (β^S-globin gene) ที่พบกระจายอยู่ในบริเวณทวีปอาฟริกา ประเทศอินเดีย และบางประเทศในแถบเมดิเตอร์เรเนียน และยีนบีตาอีโกลบิน (β^E-globin gene) ที่พบกระจายอยู่ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าการกระจายความถี่ของยีนทั้งสองนี้เป็นผลจาก founder effect ที่เกิดจากการระบาดของ *P. falciparum* ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียในอดีต หลังจากการคัดเลือกตามธรรมชาติ และเวลาที่ผ่านไปพบว่าเกิดมิวเตชันขึ้นอีกหลายรูปแบบในยีนทั้งสอง ทำให้ยีนทั้งสองนี้เป็นกุญแจสำคัญในการศึกษาต้นกำเนิด และความสัมพันธ์ระหว่างประชากร (Flint et al., 1993)

โพลิมอร์ฟิสมของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน

Antonarakis Kazazian และ Orkin (1985) เป็นคณะหนึ่งที่ศึกษาเกี่ยวกับโพลิมอร์ฟิสมของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน และจากการพบความหลากหลายของลำดับเบสในสายดีเอนเอที่ยังคงให้ผลการสังเคราะห์สายโพลิเปปไตด์ที่เหมือนกัน จึงได้ให้คำจำกัดความของดีเอนเอโพลิมอร์ฟิสมว่า "common silent or neutral variations in DNA" อย่างไรก็ตามนักวิจัยอื่น ๆ อาจให้คำจำกัดความที่แตกต่างกันออกไป แต่โดยรวมก็ยังมีความหมายถึงการมีลักษณะอัลลีล 2 อัลลีล หรือมากกว่า ที่สามารถพบได้ในประชากร และไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติ ในช่วงแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลการศึกษาดีเอนเอโพลิมอร์ฟิสมสามารถทำได้ 2 วิธีคือ (1) การศึกษาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอนเอที่โคลน (clone) จากจีโนมิคดีเอนเอ และ (2) การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ย่อยชิ้นส่วนของดีเอนเอที่ตำแหน่งตัดจำเพาะ (recognize specific sequences) ทำให้ได้ชิ้นส่วนของดีเอนเอที่มีขนาดแตกต่างกัน ตรวจสอบได้โดยการทำ Southern blot hybridization ต่อมาด้วยวิธีนี้ทำให้พบลักษณะโพลิมอร์ฟิสมในยีนกลุ่มนี้ถึง 17 ตำแหน่ง ส่วนใหญ่ทำการศึกษาในยีนบีตาธาลัสซีเมีย (β-thalassemia gene หรือ β^{thal})

ในปี ค.ศ. 1978 Kan และ Dozy (อ้างถึงใน Antonarakis et al., 1985) ศึกษาพบลักษณะโพลิมอร์ฟิสมในระดับดีเอนเอของกลุ่มยีนบีตาโกลบินเป็นครั้งแรก โดยใช้คุณสมบัติการตัดได้ (present ; +) หรือตัดไม่ได้ (absent ; -) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะรู้จักกันในชื่อ restriction site polymorphism (RSP) และต่อมาได้มีการศึกษาพบโพลิมอร์ฟิสมอีกหลายตำแหน่ง ซึ่งพบว่าโพลิมอร์ฟิสมบางชนิดพบในประชากรบางกลุ่มเท่านั้น เช่นที่ตำแหน่ง 3′β-*Bam*HI พบโพลิมอร์ฟิสมเป็น (+) ในประชากรเอเชียและอาฟริกามากกว่าทางตอนเหนือของยุโรป (Kan et al., 1980)

Antonarakis et al. (1982a) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของ RSP บนกลุ่มยีนบีตาโกลบิน 7 ตำแหน่งพบว่ามีลักษณะเป็น nonrandom association หรือ linkage disequilibrium ในช่วงของดีเอนเอ 2 ช่วง (ภาพที่ 5) ช่วงแรกตั้งแต่ปลาย 5′ ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินจนถึงยีนเดลตาโกลบิน เรียกว่า 5′-haplotype มีความยาวประมาณ 32 กิโลเบส ประกอบด้วย โพลิมอร์ฟิสม 5 ตำแหน่ง ซึ่งมีความน่าจะเป็นของการพบรูปแบบต่างๆ เท่ากับ 2^5 หรือ 32 รูปแบบ แต่ที่ในประชากรชาวอิตาเลียน กรีซ และอินเดียพบเพียง 3 รูปแบบคือ +---- -+-++ และ -++-+ มากถึง 98% จากทั้งหมด 89 โครโมโซม ในชาวอเมริกันผิวดำพบแบบ -----+ มากที่สุด ดีเอนเอช่วงที่สองเริ่มตั้งแต่ปลาย 3′ ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินจนถึงยีนบีตาโกลบินเรียกว่า 3′-haplotype มีความยาวประมาณ 12 กิโลเบส มีความสัมพันธ์แบบสุ่มกับช่วงแรก ประกอบด้วยโพลิมอร์ฟิสม 2 ตำแหน่ง พบ 3 ลักษณะ ++ +- และ -+ และ Antonarakis ให้นิยามของคำว่าดีเอนเอแฮปโพลไทป์ (DNA haplotype) ว่า "The pattern or combination of polymorphic restriction sites for any chromosome."

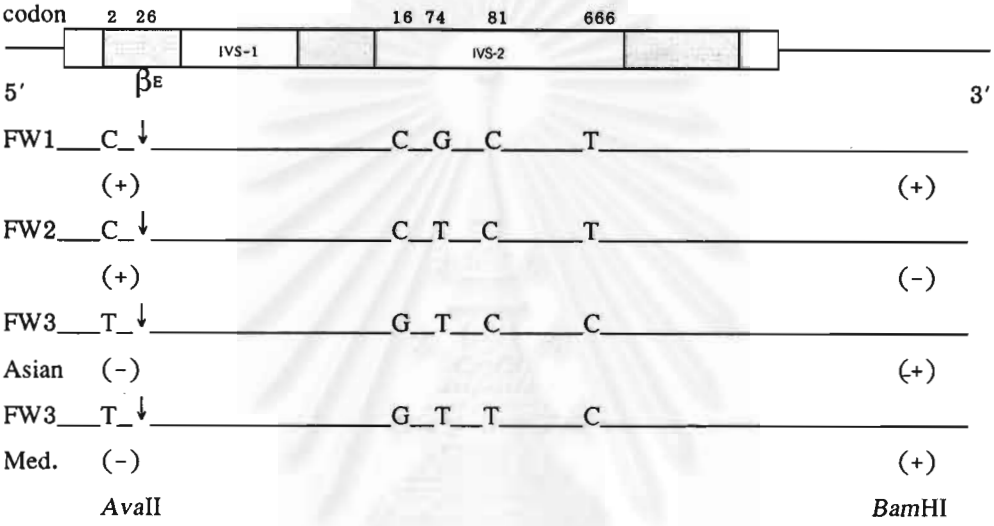


ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน ตำแหน่งโพลิมอร์ฟิสม 7 ตำแหน่ง และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ศึกษาแต่ละตำแหน่ง (Antonarakis et al., 1982a)

Orkin et al. (1982) ทำการศึกษา 3′-haplotype ของประชากรในแถบเมดิเตอร์เรเนียน เรียกส่วนนี้ว่าบีตาโกลบินเฟรมเวิร์ค (β-globin gene framework ; FW) มี 3 รูปแบบคือ FW1 (*Ava*II + *Bam*HI +) FW2 (*Ava*II + *Bam*HI -) และ FW3 (*Ava*II - *Bam*HI +) พบว่า FW2 ต่างจาก FW1 ที่ IVS-2 ตำแหน่งที่ 74 จาก G เป็น T FW3 ต่างจาก FW2 4 ตำแหน่งคือที่โคดอน 2 จาก C เป็น T IVS-2 ตำแหน่งที่ 16 จาก C เป็น G , IVS-2 ตำแหน่งที่ 81 จาก C เป็น T และ IVS-2 ตำแหน่งที่ 666 จาก T เป็น C

Antonarakis et al. (1982b) ศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินในชาวกัมพูชา ชาวลาว และชาวไทยพบว่าแฮปโพลไทป์แบบ +------+ และ +-----+- เป็นรูปแบบที่พบได้มากที่สุด โดยเป็นโครโมโซม FW3 47% และ FW2 35% ซึ่งต่างจากที่ทำการศึกษาในประชากรเมดิเตอร์เรเนียน ชาวอเมริกันผิวดำ และชาวอินเดีย ที่พบโครโมโซม FW1 เป็นส่วนใหญ่ ส่วนการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินพบว่าเป็นแบบ -+-++-FW2 แบบ +-----+-FW2 และ แบบ -+-++-+FW3 Antonarakis อธิบายว่าการที่พบ 5′-haplotype ที่เหมือนหรือแตกต่างกันในประชากรแต่ละเชื้อชาตินั้นน่าจะเกิดจาก recombination crossing over ระหว่างช่วง 5′-haplotype และ 3′-haplotype และรายงานว่า FW3 ที่พบครั้งนี้แตกต่างจาก FW3 ที่พบในเมดิเตอร์เรเนียน (Orkin et al., 1982) เพราะเป็นลักษณะที่อยู่ตรงกลาง (intermediate) ระหว่าง FW2 และ FW3 คือบริเวณ IVS-2 ตำแหน่งที่ 81 เป็น C เหมือน FW2 แทนที่จะเป็น T เหมือน FW3 ที่เคยพบในเมดิเตอร์เรเนียน จึงเรียกลักษณะนี้ว่า FW3(Asian) (ภาพที่ 6) ซึ่งพบในชาวกัมพูชาเท่านั้น Antonarakis เสนอว่าลักษณะ FW2 และ FW3(Asian) นี้มีต้นกำเนิดต่างกัน และเชื่อว่าลักษณะ FW3(Asian) นี้น่าจะเป็น independent origin ที่เกิดขึ้นในประชากรชาวเขมร

Kazazian et al. (1984) ศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบินในชาวยุโรป พบแฮปโพลไทป์เป็นแบบ -+++-β^E+-FW2 และ แบบ +---- β^E++FW1 แตกต่างจากที่พบในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นแบบ -+-++β^E+-FW2 แบบ +----β^E+-FW2 และแบบ -+-++β^E-+FW3(Asian) การพบยีนบีตาอีโกลบิน FW1 ในชาวยุโรปทำให้เชื่อว่ายีนบีตาอีโกลบินของชาวยุโรปมีต้นกำเนิดต่างไปจากของชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นข้อเสนอเกี่ยวกับการใช้ยีนบีตาอีโกลบินในการศึกษา เชื้อสายของประชากร และเสนอว่า recurrent mutation อาจไม่ได้เป็นสาเหตุเดียวที่ทำให้พบแฮปโพลไทป์หลายรูปแบบ อีกสองสาเหตุคือ (1) meiotic recombination ในช่วง 5′ ของกลุ่มยีนไปจนถึงยีนบีตาโกลบิน และ (2) specific interallelic gene conversion



ภาพที่ 6 แสดงยีนบีตาอีโกลบิน และตำแหน่งลำดับเบสที่ต่างกันในเฟรมเวิร์คแต่ละแบบ โดย FW1 และ FW2 ต่างกัน 1 นิวคลิโอไทด์ที่โคดอนที่ 74 (G→T) FW3 (Asian) ต่างจาก FW2 3 นิวคลิโอไทด์ คือโคดอนที่ 2 (C→T) โคดอนที่ 16 (C→G) และโคดอนที่ 666 (T→C) และ FW3 ต่างจาก FW3(Asian) 1 นิวคลิโอไทด์ที่โคดอนที่ 74 (C→T) ↓ คือตำแหน่งมิวเตชันของยีนบีตาอีโกลบิน ที่โคดอนที่ 26 (G→A) (+) และ (-) คือตำแหน่งที่มีการตัดได้ และตัดไม่ได้ ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava*II และ *Bam*HI

Cheng et al. (1984) ศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินในผู้ป่วยชาวจีนพบว่าจาก 31 โครโมโซมที่ทำการศึกษาเป็นโครโมโซมชนิด FW3 15 โครโมโซม และมีแฮปโพลไทป์แบบ +---- -+ จำนวน 11 โครโมโซม

Antonarakis Kazazian และ Orkin (1985) ตีพิมพ์บทความชื่อ "DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster" ตอนหนึ่งกล่าวถึงพื้นฐานของยีนบีตาโกลบินในแต่ละประชากรว่า ในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะพบโครโมโซมชนิด FW3 และ FW2 เป็นส่วนใหญ่ คือ 47% และ 35% ตามลำดับ ในชาวจีนพบโครโมโซมชนิด FW3 ได้ถึง 52% ส่วนประชากรชาวอินเดีย ชาวอเมริกันผิวดำ และชาวเมดิเตอร์เรเนียน พบโครโมโซมชนิด FW1 เป็นส่วนใหญ่คือ 52% 79% และ 53% ตามลำดับ

Wainscoat et al. (1986) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรต่างๆ ในโลก โดยใช้บีตาโกลบินแฮปโพลไทป์ เช่นเดียวกับ Long et al. (1990) พบว่า แฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินที่พบมากที่สุดในทุกประชากรคือ +---- รองลงมาคือ -+-++ ยกเว้นในประชากรอาฟริกันที่พบรูปแบบ ----+ มากที่สุด ทั้งสองเสนอว่าแฮปโพลไทป์แบบต่างๆ ที่พบน่าจะเกิดจาก single crossing over และ single base substitution

Nakatsuji et al. (1986) ศึกษาบีตาอีโกลบินแฮปโพลไทป์ในชาวเวียดนาม พบว่าจาก 22 โครโมโซม มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ -+-++ β^E+- จำนวน 13 โครโมโซม และเป็นโครโมโซมชนิด FW2 นอกจากนั้นมีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ -+-++ β^E-+ +---- β^E+- และ +---- β^E-+

Hundrieser et al. (1988) ศึกษาบีตาโกลบินแฮปโพลไทป์ และ ดีเอนเอเฟรมเวิร์คในประชากรเอเชียอาคเนย์ 3 กลุ่มคือ จากกัมพูชา จากภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าในชาวกัมพูชา แฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินเกือบทั้งหมดที่ทำการศึกษา คือ 24 โครโมโซม พบ 21 โครโมโซมเป็นแบบ +-----++ +----+- และ +-----+ ในความถี่ที่ใกล้เคียงกัน และมีบีตาอีโกลบินแฮปโพลไทป์เป็นแบบ -+-++ β^E-+ สำหรับในชาวไทยทั้งสองกลุ่มมีแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินส่วนใหญ่เป็นแบบ +---+- และมีบีตาอีโกลบินแฮปโพลไทป์เป็นแบบ -+-++ β^E+- การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์ค

ของยีนบีตาอีโกลบินในชาวกัมพูชา 50 โครโมโซม เป็นชนิด FW3 จำนวน 34 โครโมโซม ที่เหลือเป็น FW2 โดยพบการกระจายของ FW2 ลดลงเมื่อสำรวจทางตะวันออกของประเทศ ส่วนในชาวไทยทั้งสองกลุ่ม 68 โครโมโซม เป็นโครโมโซมชนิด FW2 จำนวน 67 โครโมโซม

Yongvanit et al. (1989) ศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบินในชาวโส้ จ.สกลนคร และนครพนม เป็นกลุ่มชนที่ใช้ภาษาในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับภาษาเขมร พบว่าบีตาอีโครโมโซมทั้งหมดเป็นโครโมโซมชนิด FW2 และพบแฮปโพลไทป์เพียง 2 แบบ คือ 25 โครโมโซมเป็นแบบ -+-++ β^E+- และ 10 โครโมโซมเป็นแบบ +---- β^E+-

Fucharoen G., et al. (1990) ศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์และเฟรมเวิร์คในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย-ฮีโมโกลบินอี (β-thalasemia/HbE) พบว่าโครโมโซมบีตาอีโกลบินส่วนใหญ่เป็นชนิด FW2 และสัมพันธ์อยู่กับ 5′-haplotype แบบ -+-++ ยกเว้น 2 โครโมโซมที่เป็น FW1 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ +---- β^E++ และ -+-++ β^E++ แฮปโพลไทป์แบบ +---- พบได้มากที่สุดในโครโมโซมบีตาโกลบิน

Varawalla, Fitches และ Old (1992) ศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินในชาวอินเดีย พบว่า 90% มี 5′-haplotype เป็นแบบ +---- -+-++ และ -++-+ และจากทั้งหมด 196 โครโมโซมเป็นโครโมโซมชนิด FW1 50%

เยาวลักษณ์ วิไล (2538) ศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในชาวชอง พบแฮปโพลไทป์ 5 แบบ คือ -+-++ β^E++ +---- β^E+- -+-++ β^E-+ +---- β^E-+ และ -+--- β^E-+

Fucharoen G. et al. (1997) ศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินในชนกลุ่มน้อยบางกลุ่มที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยคือ ชาวเขา จ.เชียงใหม่ ผู้ไทย จ.มุกดาหาร ชอง จ.จันทบุรี ลาวโซ่ง จ.สุพรรณบุรี และซาไก จ.ตรัง พบ 5′-haplotype 5 แบบ คือ +---- -++-+ -+-++ -+--+ และ -+--- และพบความสัมพันธ์กับ FW ทั้ง 3 รูปแบบ ส่วนในยีนบีตาอีโกลบินพบ 5′-haplotype เพียง 2 แบบคือ +---- และ -+-++ ที่สัมพันธ์อยู่กับ FW2 เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นในกลุ่มชอง ที่พบสัมพันธ์อยู่กับ FW3 มากกว่า

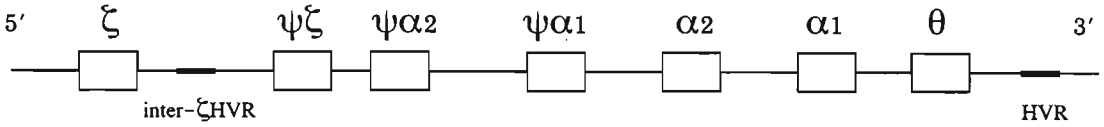
ประยุกต์ ศรีวิไล (2541) ศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในชาวกูย จ.มหาสารคาม และ จ.สุรินทร์ พบ 4 แฮปโพลไทป์ คือ $-+-++\beta^{E}+-$ $+----\beta^{E}+-$ $+---\beta^{E}-+$ และ $-+-++\beta^{E}-+$ และจาก 79 โครโมโซม เป็นโครโมโซมชนิด FW2 41 โครโมโซม พบ FW3บ้างเล็กน้อย

การตรวจสอบ β^{E}-globin haplotype และ framework

เดิมการตรวจสอบโพลิมอร์ฟิสมที่ตำแหน่งต่างๆ ทำได้ 2 วิธี คือการศึกษาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอนเอที่โคลนมาจากจีโนมิคดีเอนเอ และการศึกษาขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่ได้จากการตัดด้วย restriction enzyme ด้วยวิธี Southern blot hybridization ในปี ค.ศ. 1991 Fukumaki และ Fucharoen (อ้างโดย Fucharoen G. et al., 1997) ได้ทำการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินโดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอช่วงที่มี polymorphic site ที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) หลังจากนั้นจึงใช้ restiction enzyme ตัดชิ้นส่วนดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวน และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งวิธีนี้จะทำได้สะดวก และรวดเร็วกว่าวิธีเดิม และยังเหมาะสมต่อการศึกษาดีเอนเอจำนวนมาก

กลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin gene cluster)

กลุ่มยีนแอลฟาโกลบินเป็นกลุ่มยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 16 (16p13) มีความยาวประมาณ 26 กิโลเบส (Higgs et al., 1989) ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 7 ยีน เรียงจากปลายด้าน 5′ ไปด้าน 3′ คือ ยีนซีตาโกลบิน (ζ-globin gene) สังเคราะห์สายซีตาโกลบิน ยีนเทียมซีตา ($\psi\zeta$-globin gene) และยีนเทียมแอลฟาโกลบิน 2 ยีน ($\psi\alpha_2$-globin gene และ $\psi\alpha_1$-globin gene) ยีนแอลฟาโกลบิน 2 ยีน (α_1-globin gene และ α_2-globin gene) สังเคราะห์ให้สายแอลฟาโกลบิน และยีนธีตาโกลบิน (θ-globin gene) (ภาพที่ 7) แต่ละยีนมีโครงสร้างเป็น 2 exon และ 3 IVS เช่นเดียวกับยีนในกลุ่มบีตาโกลบิน และสายโปรตีนโกลบินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยยีนในกลุ่มนี้จะเป็นสายโกลบินในกลุ่ม α-like subunit มีความยาว 141 กรดอะมิโน จะเห็นได้ว่าบนโครโมโซมแท่งที่ 16 นี้ มียีนแอลฟาโกลบินที่ทำงานได้อยู่ 2 ยีน มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันมาก และสังเคราะห์ให้สายแอลฟาโกลบินที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน ทำให้ในคนปกติจะมียีนแอลฟาโกลบินทั้งหมด 4 ยีน เขียนลักษณะจีโนไทปได้เป็น $\alpha\alpha/\alpha\alpha$



ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างของกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน

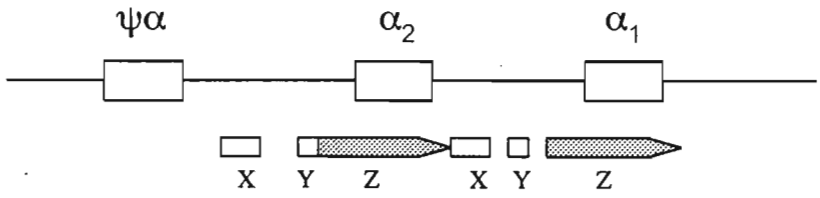
ลักษณะพิเศษของยีนกลุ่มแอลฟาโกลบินคือ ยีนกลุ่มนี้เป็น multigene family แต่ละยีนจะมีลำดับเบสคล้ายกัน และพบช่วงของดีเอนเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ กันที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I ที่เรียกว่า *Alu* family ซึ่งลักษณะดังกล่าวทำให้ช่วงของดีเอนเอที่มีลำดับเบสที่ซ้ำๆ กันนี้ (repetitive sequence) มีโอกาสที่จะเกิดการจัดเรียงตัวของช่วงดีเอนเอที่ผิดปกติได้ เป็นสาเหตุที่ทำให้บางช่วงของยีนในกลุ่มแอลฟาโกลบินขาดหายไป ในประชากรทั่วไปสามารถตรวจพบลักษณะการขาดหายของช่วงดีเอนเอที่จัดแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบใหญ่ คือรูปแบบที่ยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไป 1 ยีน (-α) และรูปแบบที่ยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปทั้งสองยีน (--) (ปราณี (วินิจจะกูล) ฟู่เจริญ, 2541)

ลักษณะที่ยีนแอลฟาโกลบินยีนใดยีนหนึ่งขาดหายไปเกิดเนื่องจากโครงสร้างของยีนแอลฟา 2 (α_2)และยีนแอลฟา 1 (α_1) มีลำดับเบสที่คล้ายกันมาก โดยมีช่วงของลำดับเบสที่เหมือนกัน (homology box) อยู่ 3 ช่วง คือ X Y และ Z box (ภาพที่ 8) ทำให้ในขั้นตอนของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะที่มีการเกิดรีคอมบิเนชั่น หากมีการจับคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมคลาดเคลื่อนไป และเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม (unequal crossing over) จะทำให้เกิดการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินบางส่วน ในประชากรส่วนใหญ่พบ 2 กรณี คือ

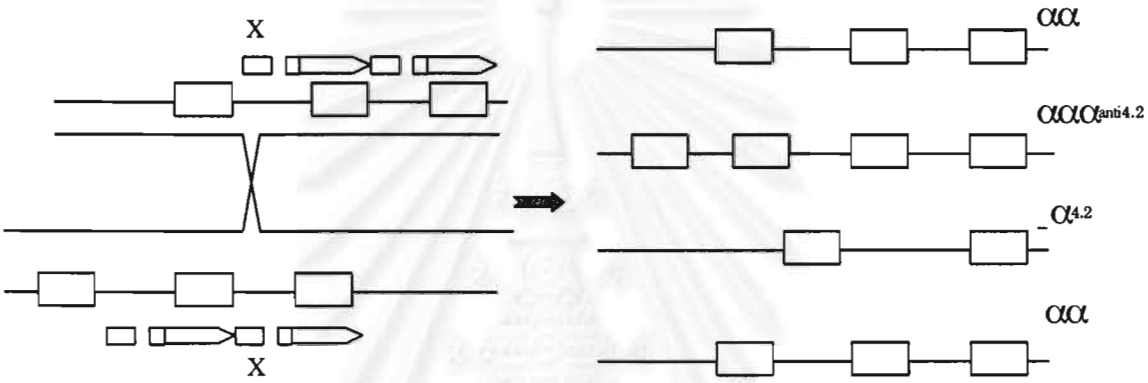
1. leftward deletion คือ unequal crossing over เกิดขึ้นที่บริเวณ X box จะทำให้ดีเอนเอบริเวณ α_2-gene ขนาด 4.2 กิโลเบส ถูกย้ายจากโครโมโซมแท่งหนึ่งไปยังอีกแท่งหนึ่ง ผลที่ได้คือโครโมโซมแท่งหนึ่งจะมียีนแอลฟาโกลบินเพียง 1 ยีน (single α-globin gene) เขียนสัญลักษณ์อย่างง่ายได้เป็น $-\alpha^{4.2}$ ส่วนอีกโครโมโซมหนึ่งมียีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีน (triplicated α-globin gene) เขียนสัญลักษณ์อย่างง่ายได้เป็น $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ (ภาพที่ 9)

2. rightward deletion คือ unequal crossing over เกิดขึ้นที่บริเวณ Z box จะทำให้ดีเอนเอบริเวณ α_2-gene และ α_1-gene ขนาด 3.7 กิโลเบส ถูกย้ายจากโครโมโซมแท่งหนึ่งไปยังอีกแท่งหนึ่ง ผลที่ได้คือโครโมโซมแท่งหนึ่งจะมียีนแอลฟาโกลบินเพียง 1 ยีน (single α-globin gene) เขียนสัญลักษณ์อย่างง่ายได้เป็น $-\alpha^{3.7}$ ส่วนอีกโครโมโซมหนึ่งมียีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีน เขียนสัญลักษณ์อย่างง่ายได้เป็น $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ (ภาพที่ 10)

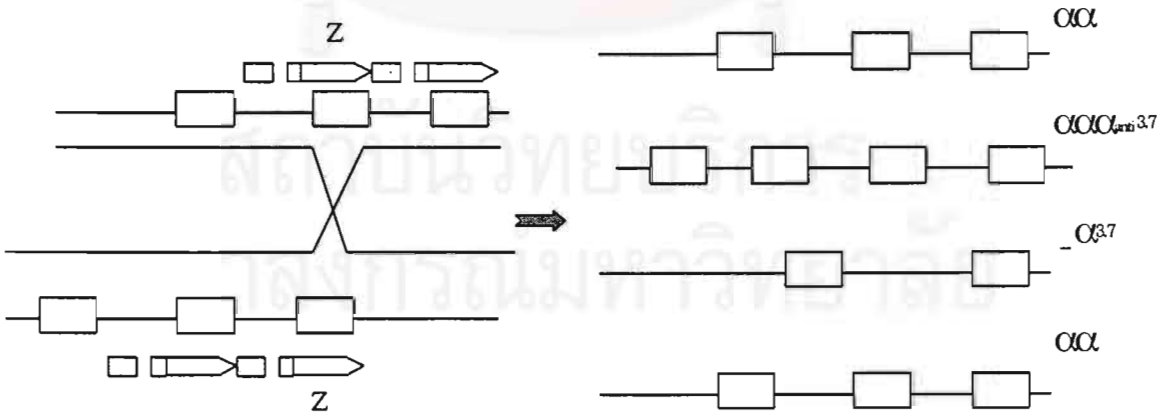
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 8 แสดงการเรียงตัวของ homology box X Y และ Z ของยีนแอลฟาโกลบิน



ภาพที่ 9 แสดงกลไกการเกิด leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) ของยีนแอลฟาโกลบิน



ภาพที่ 10 แสดงกลไกการเกิด rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) ของยีนแอลฟาโกลบิน

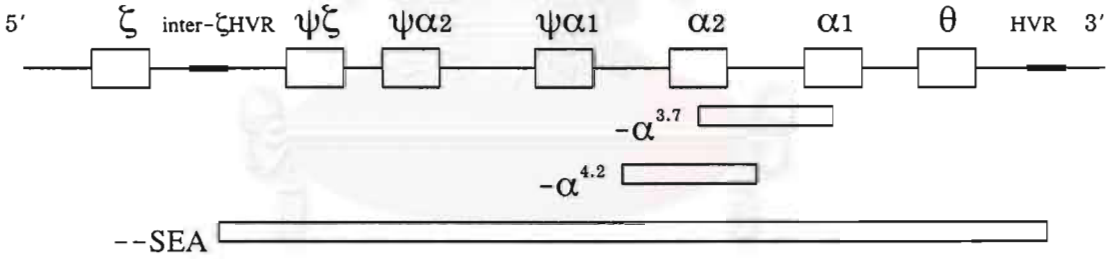
เนื่องจากการเกิด unequal crossing over นี้สามารถเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ดังที่กล่าวไปแล้ว ทำให้มีการส่งผ่านโครโมโซมที่เป็น single α-globin gene และ triplicated α-globin gene ไปยังรุ่นลูกต่อ ๆ ไป แต่ด้วยการคัดเลือกตามธรรมชาติบางอย่าง ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากการติดเชื้อมาลาเรียทำให้พบว่ามีอุบัติการณ์ของ single α-globin gene ในกลุ่มประชากรต่าง ๆ แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) โดยบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบความถี่ของยีน -α (รวมทั้ง $-\alpha^{3.7}$ และ $-\alpha^{4.2}$) เท่ากับ 0.01-0.11 (Higgs et al., 1989) ในขณะที่ตรวจพบอุบัติการณ์ของ triplicated α-globin gene ต่ำมาก อาจเนื่องจากไม่ได้รับอิทธิพลของการคัดเลือกตามธรรมชาติ (ปราณี (วินิจจะกูล) ฟู่เจริญ, 2541) ส่วนใหญ่มักรายงานถึง triplicated α-globin gene ที่สัมพันธ์อยู่กับบีตาธาลัสซีเมีย เช่นในสหรัฐอเมริกา (Kanavakis et al., 1983) ซานีเดีย (Galanello et al., 1983) อย่างไรก็ตามพบว่าการกระจายความถี่ของอัลลีลทั้ง 2 นี้อาจไปเป็นไปในทางเดียวกันกับการระบาดของโรคมาลาเรียเสมอไป (Flint et al., 1993) เนื่องจากในบางพื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของโรคมาลาเรียก็สามารถพบลักษณะการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินทั้งสองรูปแบบนี้ได้

ตารางที่ 2 การกระจายของกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินในภูมิภาคต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Higgs et al., 1989)

	f (- α)	ααα	- - หรือ $-\alpha^{0}$
North Europe	0.00-0.01	+	S
Mediterranean	0.04-0.18	+	+
West Africa (Jamaica + US black)	0.08-0.24	+	S
South Africa	0.06-0.15	+	S
East Africa	0.26	0	0
Middle East	0.08-0.04	+	0
Indian, Burma, Srilanka	0.05-0.98	+	S
Southeast Asia	0.01-0.11	+	+
Southwest Pacific	0.3-0.89	+	0

หมายเหตุ + หมายถึง มีรายงานว่าพบ (ไม่บอกความถี่ที่พบ)
S หมายถึง นาน ๆ พบครั้ง
0 หมายถึงไม่มีรายงาน

นอกจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินยีนใดยีนหนึ่งดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินอีกรูปแบบหนึ่งคือ ยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปทั้ง 2 ยีน ทำให้บนโครโมโซมแท่งนั้นไม่มียีนแอลฟาโกลบินเหลืออยู่เลย เขียนเป็นสัญลักษณ์อย่างง่ายได้เป็น (--) การขาดหายไปในลักษณะนี้มิได้เกิดจาก unequal crossing over เหมือนในกรณีแรก แต่เกิดจากการย้ายสลับที่ของดีเอนเอระหว่างโครโมโซมแบบไม่มีกฎเกณฑ์ (illegitimate recombination หรือ non-homologous recombination) ทั้งนี้คาดว่าช่วงของ *Alu* family ที่อยู่ในกลุ่มยีนน่าจะมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดเหตุการณ์นี้ (Higgs et al., 1989; Harteveld et al., 1997) และจะทำให้เกิดการขาดหายไปของดีเอนเอเป็นช่วงยาว พบว่ารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในลักษณะนี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละประชากร ซึ่งแตกต่างจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ leftward deletion และ rightward deletion ที่สามารถพบได้ในทุกประชากร โดยในปี ค.ศ. 1989 Higgs et al. ได้รายงานถึงการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในประชากรต่างๆ เช่น ในประชากรทางตอนเหนือของประเทศอังกฤษ พบการขาดหายไปแบบ --BRIT (British type) ในชาวอาฟริกันพบแบบ --SA (South Africa) และในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบแบบ --SEA (Southeast Asian type) --FIL (Filipino type) และ --THAI สำหรับในประเทศไทยพบว่าการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินทั้งสองยีนส่วนใหญ่เป็นแบบ --SEA



ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างของยีนแอลฟาโกลบิน และการขาดหายไปชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย

การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินที่เกิดขึ้นทั้งสองรูปแบบจะเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมที่เรียกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย (α-thalassemia) ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบได้มากรูปแบบหนึ่งในประชากรไทย โดยในปี ค.ศ. 1995 Winichagoon อ้างถึงอุบัติการณ์ของแอลฟาธาลัสซีเมีย (ทั้ง -α และ --) ที่พบในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย และประเทศลาวสูงถึง 30-40%

ปี ค.ศ. 1997 Fucharoen S. อ้างถึงแอลฟา ธาลัสซีเมียที่พบในกรุงเทพฯ 20.4% จ.เชียงใหม่ 30.6% ประเทศลาว 44.0% ประเทศพม่า 10.5% ประเทศมาเลเซีย 3-5% และประเทศอินโดนีเซีย 0.5%

Sriroongrueng et al. (1997) ทำการศึกษาเลือดจากรก และตัวอย่างเลือดจากทารกแรกเกิดในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ภาคใต้ รายงานอุบัติการณ์ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ (-α) และ (--) เท่ากับ 12.0% และ 4.3% ภายใต้ความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.065 และ 0.022 ตามลำดับ ความผิดปกติที่เกิดขึ้นนี้เชื่อว่าเป็นส่วนหนึ่งที่ได้รับอิทธิพลจากการคัดเลือดตามธรรมชาติ ด้วยกลไกการคัดเลือกที่มีต่อโรคมาลาเรีย นอกจากนี้ยังรายงานพบอุบัติการณ์ของ $\alpha\alpha\alpha$ เท่ากับ 1% ภายใต้ความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.005

Hofgartner Keefe และ Tait (1997) รายงานการศึกษาแอลฟาธาลัสซีเมียในชาวเอเชียอเมริกันประกอบด้วยผู้มีเชื้อสายฟิลิปปินส์ จีน เวียดนาม กัมพูชา ลาว และ ไทย พบอุบัติการณ์ - $\alpha^{3.7}$ 23.96% และ --SEA 10.42%

ถวัลยวงศ์ รัตนศิริ และคณะ (2539) รายงานอุบัติการณ์ของแอลฟาธาลัสซีเมียในทารกแรกคลอด จ.ขอนแก่น เท่ากับ 19.8% โดยในจำนวนนี้เป็น --SEA 3%

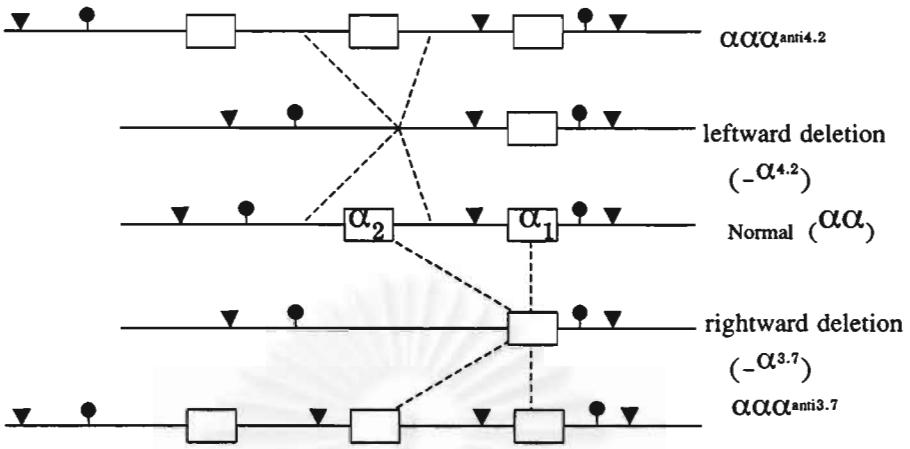
อุไรวรรณ ยิ้มประเสริฐ และ แขไข ไพกะเพศ (2540) รายงานอุบัติการณ์ของ --SEA เท่ากับ 11.32% ในบุคคลทั่วไปใน จ.ขอนแก่น ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจกรองธาลัสซีเมียแล้ว

ประยุกต์ ศรีวิไล (2541) ศึกษารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบินในชาวกูย จ.มหาสารคาม และ จ.สุรินทร์ พบความถี่ของ -$\alpha^{4.2}$ เท่ากับ 0.010 -$\alpha^{3.7}$ เท่ากับ 0.159 และ --SEA เท่ากับ 0.027

การตรวจหารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบิน

การตรวจหารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบินที่ขาดหายไปเพียง 1 ยีนสามารถทำได้โดยการทำ Southern blot จีโนมิกดีเอนเอ (genomic DNA) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Bgl*II หลังจากนั้น hybridize ด้วย α-probe ที่ได้จากพลาสมิด pUC9 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ติดฉลาก α-probe ด้วย digoxigenin ตามวิธีของ Boringer-Mannheim Germany (Sanchaisuriya et al., 1997) การย่อยจีโนมิกดีเอนเอด้วย *Bam*HI และติดตามด้วย α-probe โครโมโซมที่มีจำนวนแอลฟาโกลบินยีนปกติ จะให้แถบดีเอนเอที่มีขนาด 14 กิโลเบส ส่วนโครโมโซมที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินจะให้แถบดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส และถ้าโครโมโซมมียีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีนจะให้แถบดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 18 กิโลเบส ซึ่งถ้าเอาจีโนมิกดีเอนเอของรายที่พบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน และรายที่มียีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีน ไปย่อยด้วยเอนไซม์ *Bgl*II จะทำให้สามารถตรวจสอบรูปแบบของยีนได้โดยโครโมโซมปกติจะให้แถบดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 12.6 กิโลเบส และ 7.4 กิโลเบส รายที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาแบบ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) จะให้แถบดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 7.4 กิโลเบส ส่วนรายที่มีการขาดหายไปแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) จะให้แถบดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 16 กิโลเบส สำหรับโครโมโซมที่มียีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีนแบบ $\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$ จะให้แถบดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 7.4 กิโลเบส และ 16 กิโลเบส ส่วนโครโมโซมที่มียีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีนแบบ $\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$ จะให้แถบดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 3.7 กิโลเบส 7.4 กิโลเบส และ 12.6 กิโลเบส (Trent et al., 1981) (ภาพที่ 12 ตารางที่ 3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 12 แสดงโครงสร้างของยีนแอลฟาโกลบินรูปแบบต่าง ๆ และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH*I (▼) และ *Bgl*II (●)

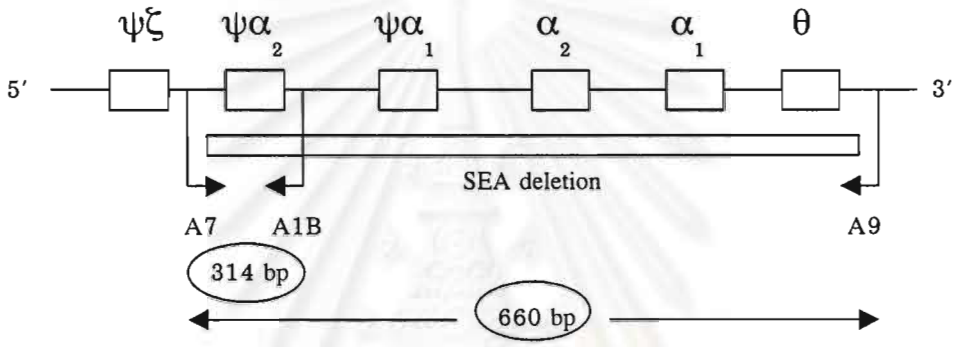
ตารางที่ 3 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอ (กิโลเบส) ของยีนแอลฟาโกลบิน ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH*I และ *Bgl*II และติดตามด้วย α-probe (Trent et al., 1981)

	Normal	- $\alpha^{4.2}$	- $\alpha^{3.7}$	$\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$	$\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$
*BamH*I	14	9.8	10.3	17.7	18
*Bgl*II	12 , 7.4	7.4	16.0	16 , 7.4	12 , 7.4 , 3.7

Southern blot hybridization

Southern blot hybridization เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอนเอที่ต้องการศึกษา โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะย่อยจีโนมิคดีเอนเอให้เป็นดีเอนเอชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปแยกขนาดในสนามไฟฟ้า (gel electrophoresis) ดีเอนเอขนาดต่าง ๆ จะถูกแยกออกจากกัน หลังจากนั้นย้ายชิ้นส่วนของดีเอนเอไปไว้บนแผ่นเยื่อไนลอน (nylon membrane) แล้วตรวจหาชิ้นดีเอนเอที่ต้องการโดยใช้ดีเอนเอติดตาม (DNA probe) ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีหรือสารเคมีที่สามารถทำให้เกิดสีได้ เข้าจับกับชิ้นดีเอนเอที่อยู่บนแผ่นเยื่อไนลอน หลังจากนั้นจะสามารถตรวจหาแถบของดีเอนเอชิ้นที่ต้องการศึกษาโดยทำให้ปรากฏแถบสีของดีเอนเอติดตาม (Sanchaisuriya et al., 1997)

ในกรณีที่ยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปทั้งสองยีนจะทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี Southern blot hybridization ด้วย α-probe ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะตรวจหาการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (--SEA) ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ตามวิธีของ Fucharoen G. และ Fucharoen Sp. (1994) โดยใช้ primer A7 (5′ CTCTGTTTCTCAGTATTGGAG 3′) กับ A1B (5′ GGTTCCCTGAG CCCCGACACG 3′) ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอของโครโมโซมปกติ ขนาด 314 คู่เบส และใช้ primer A7 กับ A9 (5′ ATATA TGGGTCTGGAAGTGTATC 3′) ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอนเอข้างเคียงส่วนที่ขาดหายไป ขนาด 660 คู่เบส (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 แสดง primer และตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (--SEA) ด้วยวิธี PCR

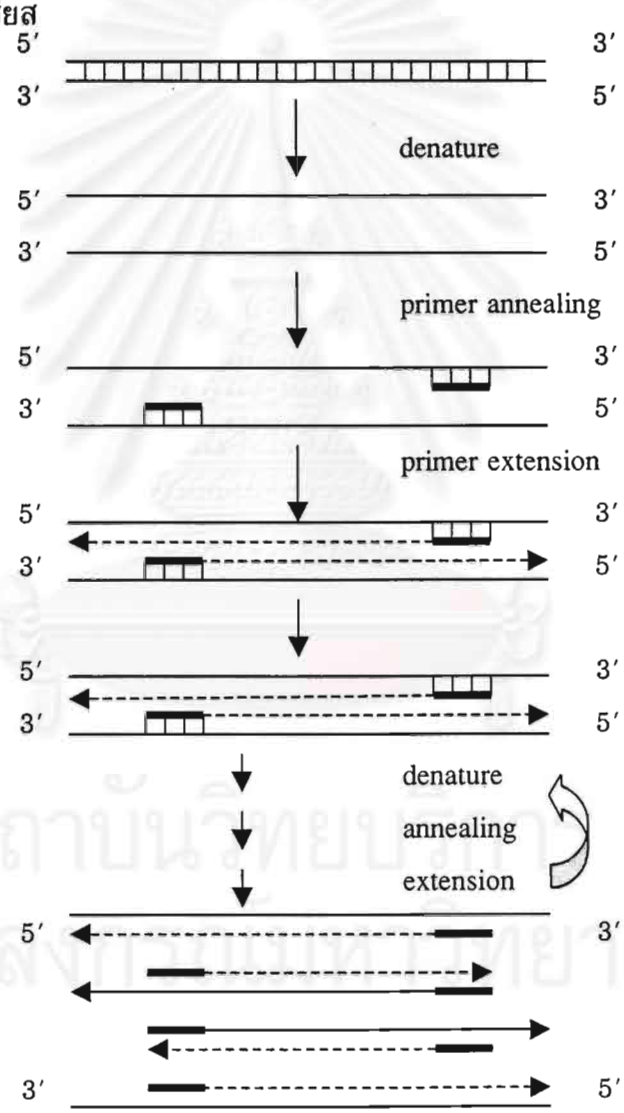
Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR หรืออีกชื่อหนึ่งว่า in vitro enzymatic gene amplification คือเทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอนเอที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยอาศัยดีเอนต้นแบบ และ oligonucleotide สายสั้นๆ หรือไพรเมอร์ (primer) 2 ชุดที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary) กับลำดับเบสด้านปลายทั้งสองด้านของช่วงดีเอนเอที่สนใจ และใช้เอนไซม์จำพวก DNA polymerase มาทำให้สายของดีเอนเอยาวออกไปโดยการจับเอา dNTPs (dATP dTTP dCTP และ dGTP) ชนิดใดชนิดหนึ่งมาเข้าคู่กับลำดับเบสของดีเอนเอต้นแบบ ได้เป็นดีเอนเอสายใหม่ เมื่อทำการเพิ่มจำนวนหลายๆ รอบก็จะได้ปริมาณดีเอนเอเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก แต่ละรอบประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 14) (ปราณี (วินิจจะกูล) ฟู่เจริญ, 2541) คือ

1. denature เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอนเอสายคู่ (double strand DNA) ต้นแบบแยกออกจากกันเป็นดีเอนเอสายเดี่ยว (single strand DNA) โดยอาศัยอุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. primer annealing เป็นขั้นตอนที่ทำให้ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอนเอสายเดี่ยวต้นแบบตรงตำแหน่งที่เป็นคู่สม โดยลดอุณหภูมิลงจนถึงประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส

3. primer extension เป็นขั้นตอนที่เพิ่มความยาวของดีเอนเอสายใหม่โดยการเติม dNTP ที่เป็นคู่สมกับดีเอนเอต้นแบบเข้าที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ และขยายออกไปเรื่อย ๆ ทางด้าน 5′ โดยอาศัยเอนไซม์ polymerase และอุณหภูมิที่เหมาะสม ส่วนใหญ่ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 14 แสดงขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอที่ต้องการโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

บทที่ 3

สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมี

	ชื่อบริษัท
1. agarose	SEAKEM®
2. aมิลลิโมลาร์onium chloride (NH_4Cl)	Carlo Erba
3. boric acid (HBr)	Sigma
4. bromophenol blue	
5. carbon tetrachloride (CCl_4)	Carlo Erba
6. chloroform	
7. dextran	Sigma
8. digoxygenin detection and labeling kit	Boeringer Mannheim
8.1 hexanucleotide	
8.2 dNTPs mixture	
8.3 klenow enzyme	
8.4 lithium chloride (LiCl)	
8.5 N-laury sarcosine	
8.6 blocking powder	
8.7 Dig-antibody	
8.8 nitroblue tetrazolium salt (NBT)	
8.9 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-phosphste)	
9. dNTP mixture (dATP , dGTP , dCTP, DTTP)	Promega
10.*E. coli* YF203 with α DNA- pUC9 plasmid	
11.ethanol	
12.ethidium bromide	Sigma
13.ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (Na_2EDTA)	Fluka
14.glacial acetic acid (CH_3COOH)	Sigma
15.hydrochloric acid (HCl)	Sigma
16.Luria-Bertani (LB) broth	Sigma

17.magnesium chloride ($MgCl_2$)	Fluka
18.phenol	
19.ponceau S	Sigma
20.potassium acetate (CH_3COOK)	Carlo Merck
21.potassium carbonate (K_2CO_3)	Carlo Erba
22.sodium acetate (CH_3COONa)	Carlo Merck
23.sodium chloride (NaCl)	Carlo Merck
24.sodium dodecylsulphate (SDS)	Sigma
25.sodium hydroxide (NaOH)	Carlo Merck
26.tris base	Sigma
27.trichloroacetic acid (CH_3COOCl_3)	Sigma
28.trisodium citrate	Carlo Merck
29.xylene cyanol	
30.λ-DNA	
31.λ-DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind*III เป็น size marker	

Oligonucleotide Primer

	ลำดับเบส
1. A1B	5′ GGTTCCCTGAGCCCCGACACG 3′
2. A7	5′ CTCTGTGTTCTCAGTATTGGAG 3′
3. A9	5′ ATATATTGGGTCTGGAAGTGTATC 3′
4. G8	5′ GCTTGGACTCAGAATAATCC 3′
5. SF1	5′ GCCCACATCACCAAGGCAAT 3′
6. SF2	5′ GCTCTACGGATGTGTGAGAT 3′
7. SF3	5′ GTTTGTGTGTGTGTGAGAGC 3′
8. SF4	5′ TCTTTAGGCATGCGTCAACA 3′
9. SF5	5′ TTAACGTCTTCAGCCTACAA 3′
10.SF6	5′ CAATCTGCACACTTGAGGGGC 3′
11.SF7	5′ GGCACATGGATCGAATTGAA 3′
12.SF8	5′ ACCATGATGCCAGGCCTGAG 3′
13.SF9	5′ GGGAACAGAAGTTGAGATAG 3′

14.SF10	5′ CTCTTTTCTTGCAGGATTGC 3′
15.SF11	5′ GCTCCATGAACAAACATTCC 3′
16.SF12	5′ AAGGAGCACCCACTAGCTCA 3′
17.YK15	5′ TCTCTCTGCCTATTGGTCTA 3′

เอนไซม์

	ชื่อบริษัท
1. *Ava*II with buffer C	Promega
2. *Bam*HI with buffer E	Promega
3. *Bgl*II with buffer D	Promega
4. DNA polymerase with 10X PCR buffer	Biotool
5. *Eco*RI with buffer E	Promega
6. *Hinc*II with buffer B	Promega
7. *Hind*III with buffer B	Promega
8. Pronase E	Sigma
9. RNase A	Sigma
10. *Taq* polymerase with 10X PCR buffer	Promega

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุสำหรับการเก็บตัวอย่างเลือด
   - disposable syringe
   - disposable needle
   - EDTA vacuum tube (3 มิลลิลิตร)
   - สายยางรัดแขน
   - สำลี
   - พลาสเตอร์ปิดแผล
   - ถุงมือยาง
2. microtube (0.1 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร)
3. micropipet (10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร)
4. microcentrifuge

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. refrigerated centrifuge
6. vortex mixture
7. electrophoresis set

   10.1 Mupid-2 minigel electrophoresis system (Japan)

   10.2 BIO-RAD power PAC 3000 (Belgium)

   แต่ละชุดประกอบด้วย

   - electrophoresis chamber
   - gel tray หรือ แผ่นกระจก (สำหรับ minigel)
   - comb
   - power supply
8. Gel Doc 1000 (program Molecular analysis) (BIO-RAD)
   - personal computer
   - UV tray
   - camera hood
9. thermal printer
10. haemoglobin electrophoresis set (Helena Lab.)
   -electrophoresis chamber
   - sample apllicator
   - power supply
11. Sepraphore III cellulose acetate (Gelman)
12. อุปกรณ์สำหรับ Southern blotting
   - nitrocellulose nylon membrane positive charge (Boehringer mannheim)
   - กระดาษกรองอย่างหนาแผ่นใหญ่ (3M)
   - กระดาษซับ เช่นกระดาษหนังสือพิมพ์
   - กล่องใส่ buffer
   - ถุงพลาสติกอย่างหนา
13. เครื่อง PCR
   - PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycle 480 (U.S.A.)
   - PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 9600 (U.S.A.)
14. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส
15. water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 65 องศาเซลเซียส

16. hot air oven อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส

17.microwave oven

18.hot plate stirer

19.autoclave

20.pH meter

21.เครื่องชั่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิธีการดำเนินการศึกษา

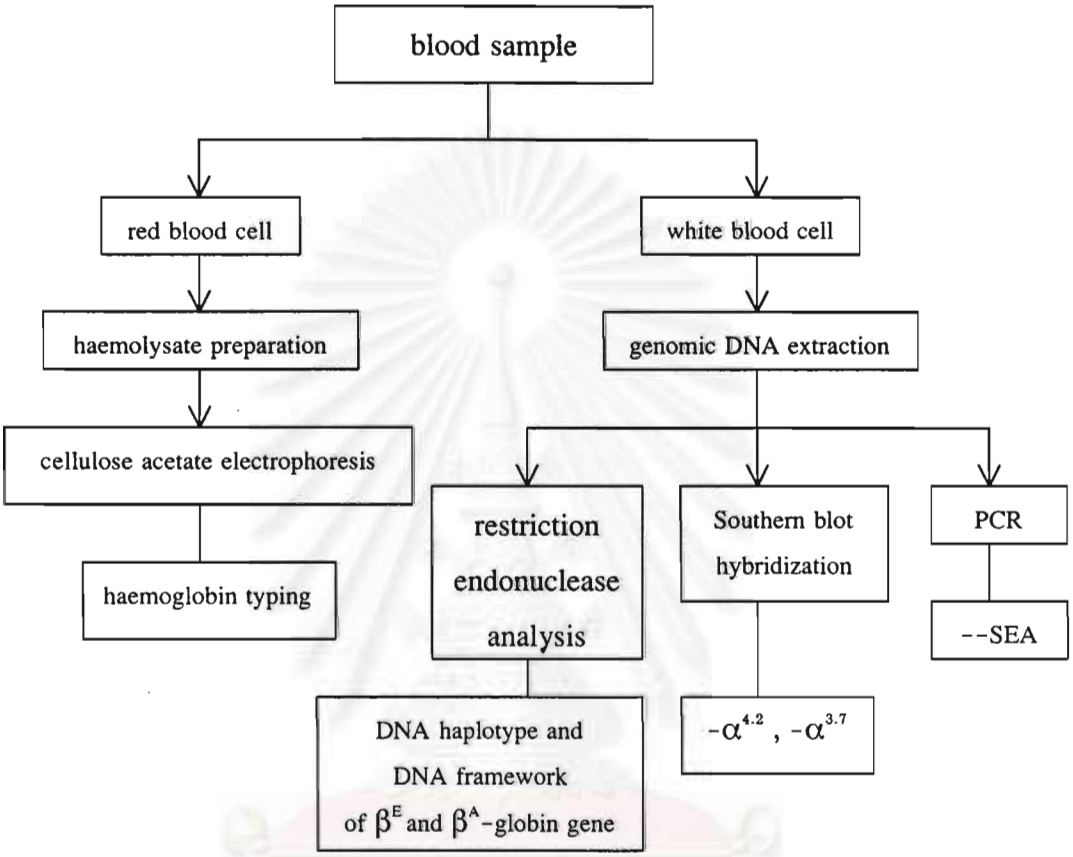
ขั้นตอนการศึกษาทั้งหมดแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้ (ภาพที่ 15)

1. การเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรชาวไทพวน
2. การศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน
3. การสกัดจีโนมิคดีเอนเอจากเม็ดเลือดขาว
4. การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์ค และดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน
5. การศึกษารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบิน

5.1 การศึกษารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบินชนิด leftward deletion และ rightward deletion ด้วยวิธี Southern blot hybridization

5.2 การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด --SEA ด้วยวิธี PCR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

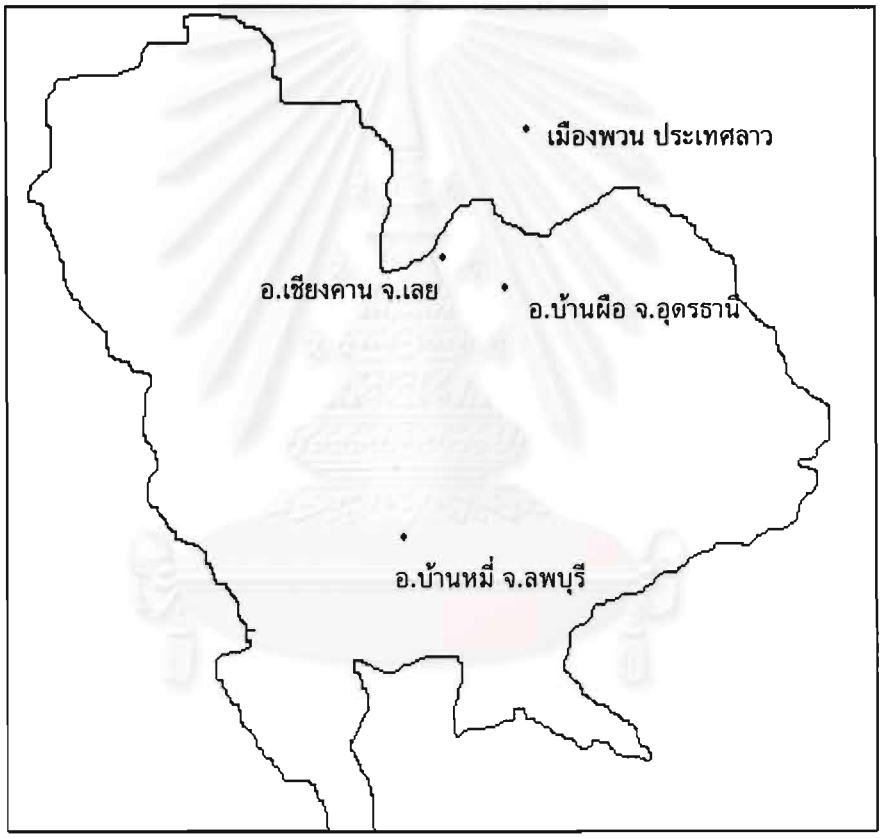


ภาพที่ 15 แสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรไทพวน 3 กลุ่ม (ภาพที่ 16) คือ ประชากรไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี 89 ตัวอย่าง ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย 74 ตัวอย่าง และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี 69 ตัวอย่าง ปริมาตรตัวอย่างละ 1 มล. โดยใช้ EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด



ภาพที่ 16 แสดงที่ตั้งของกลุ่มประชากรไทพวนที่ทำการศึกษาทั้ง 3 กลุ่ม โดยสังเขป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน

2.1 การเตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน (haemolysate)

2.1.1 แบ่งเลือด 0.5 มล. ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มล. เติมสารละลาย 3% dextran 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนเม็ดเลือดแดงตกตะกอน

2.1.2 ดูดเอาสารละลายส่วนบนใส่หลอดพลาสติก ขนาด 1.5 มล. หลอดใหม่ เก็บไว้เพื่อเตรียมเป็นดีเอนเอต่อไป

2.1.3 ล้างตะกอนเม็ดเลือดแดง โดยเติม 0.9% NaCl เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที 5 นาที และดูดน้ำเกลือส่วนบนทิ้งไป ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือจนกว่าน้ำเกลือจะใส ครั้งสุดท้ายดูดน้ำเกลือทิ้งไป

2.1.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 เท่าของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นที่เหลืออยู่ เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก

2.1.5 เติม CCl_4 ปริมาตร 0.5 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ เขย่าด้วยเครื่อง vortex หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบ/นาที 5 นาที

2.1.6 ดูดน้ำละลายฮีโมโกลบินแยกชั้นอยู่ด้านบนออกมาเก็บไว้ โดยระวังไม่ให้มีโปรตีนและเศษเซลล์ที่อยู่ชั้นกลางปนมาด้วย

2.1.7 สารละลายฮีโมโกลบินที่ได้นำไปหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis

2.2 การหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis

2.2.1 แช่แผ่น cellulose acetate ใน TBE buffer (pH8.6) นานอย่างน้อย 5 นาที ซับบัฟเฟอร์ที่มากเกินพอออก

2.2.2 หยดน้ำละลายฮีโมโกลบินลงบนแผ่น cellulose acetate โดยใช้อุปกรณ์หยดน้ำละลายฮีโมโกลบิน (sample applicator)

2.2.3 ขึงแผ่น cellulose acetate ในกล่องใส่บัฟเฟอร์ตัวนำไฟฟ้า โดยให้ปลายทั้งสองพาดอยู่บนกระดาษกรองที่จุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์ และปลายด้านที่มีน้ำละลายฮีโมโกลบินอยู่ทางขั้วลบ

2.2.4 ปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปในกล่องใส่บัฟเฟอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ประมาณ 350 - 400 โวลต์ ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 20 - 30 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบฮีโมโกลบินแยกออกจากกันชัดเจน

2.2.5 นำแผ่น cellulose acetate ที่แยกชนิดของฮีโมโกลบินแล้ว แช่ลงในกล่องใส่สีย้อม ponceau S 5 นาที

2.2.6 ล้างสีออกด้วย 5% acetic acid หลายๆ ครั้งจนกว่า background จะขาว

2.2.7 บันทึกผล และนำผลที่ได้ไปหาคำนวนความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน

3. การเตรียมจีโนมิคดีเอนเอ

3.1 การสกัดจีโนมิคดีเอนเอ

3.1.1 สารละลาย dextran ที่ได้จากการแยกเม็ดเลือดแดง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที 5 นาที ทิ้งสารละลายด้านบน เก็บไว้เฉพาะตะกอนเม็ดเลือดขาว

3.1.2 เติม lysis buffer 400 ไมโครลิตร เขย่าแรงๆ ด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตก หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที 5 นาที ดูด lysis buffer ด้านบนทิ้งไปให้มากที่สุด เก็บตะกอนไว้

3.1.3 เติมสารละลาย SE buffer 300 ไมโครลิตร 20% SDS 15 ไมโครลิตร และ pronase E 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

3.1.4 เติม 6 โมลาร์ NaCl 85 ไมโครลิตร โปรตีนจะตกตะกอนออกมา

3.1.5 เติม 100% ethanol **ที่แช่เย็นลงไป 800 ไมโครลิตร** เขย่าแรงๆ ดีเอนเอจะหลุดออกจากโปรตีน และตกตะกอนเห็นเป็นเส้นใยสีขาว

3.1.6 ใช้ autopipet ดูดเอาตะกอนดีเอนเอใส่ลงในหลอดใหม่ เติม 70% ethanol ที่แช่เย็นลงไป 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นดูดออกให้หมด นำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 นาที

3.1.7 ละลายดีเอนเอด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.8 ตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.2 การตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอนเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.2.1 เตรียม 1% agarose gel โดยละลาย agarose 1 กรัมใน 1X E buffer 100 มล. ด้วยเครื่องไมโครเวฟ

3.2.2 จัดแผ่นกระจก โดยวางหวี (comb) ไว้ที่ส่วนปลายด้านหนึ่งในแนวดิ่ง ให้สูงจากกระจก ประมาณ 1 มม.

3.2.3 เทเจลลงบนกระจก ให้มีความหนาประมาณ 2-3 มม. รอจนเจลแข็งตัวดี จึงดึงหวีออก ซึ่งจะทำให้มีหลุมในเนื้อเจล

3.2.4 วางเจลที่แข็งตัวแล้วลงในกล่องตัวนำไฟฟ้าที่เติม TAE buffer ไว้แล้ว โดยวางด้านที่มีหลุมไว้ทางขั้วลบ

3.2.5 ผสมดีเอนเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร 6X dye 1 ไมโครลิตร และ TE buffer 4 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมทางหัวเจล เปรียบเทียบกับ λ-DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Hind*III เป็น size marker และ λ-DNA ที่ทราบความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ผสมกับ 6X dye 1 ไมโครลิตร และ TE buffer 4 ไมโครลิตร เช่นเดียวกัน เพื่อประมาณความเข้มข้นของดีเอนเอที่สกัดได้

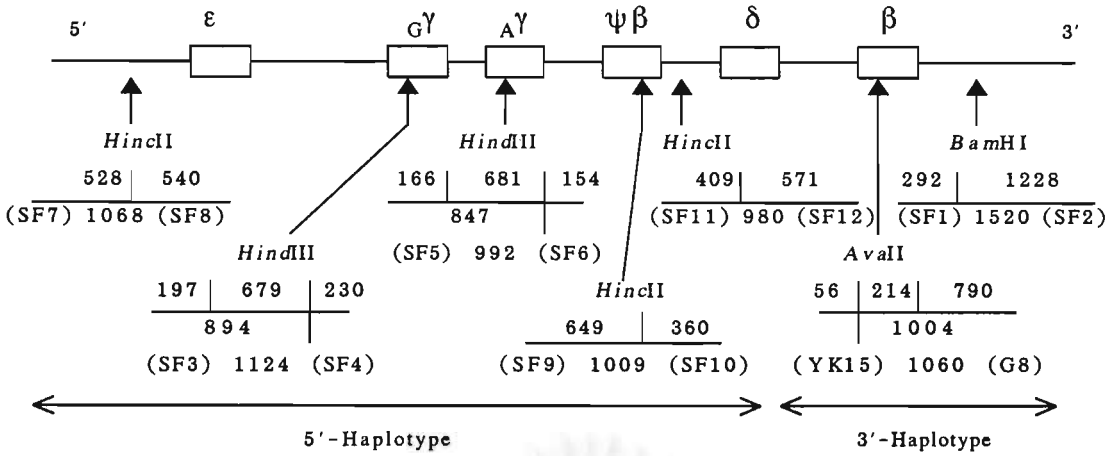
3.2.6 ผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เข้าสู่กล่องบัฟเฟอร์ตัวนำประมาณ 15-20 นาที หรือจนกระทั่งเห็นแถบสีวิ่งเข้าสู่ขั้วบวกได้ประมาณ 2 ใน 3 ของความยาวกระจก

3.2.7 นำแผ่นเจลแช่ลงในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 10 นาที

3.2.8 ศึกษาแถบดีเอนเอด้วยเครื่อง Gel Doc 1000 โปรแกรม Molecular Analysis และบันทึกภาพด้วย thermal printer

4. การศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ และดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาโกลบิน

4.1 เพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอนเอที่ต้องการศึกษาทั้ง 7 ชิ้นส่วนด้วยไพรเมอร์คู่ต่าง ๆ (ภาพที่ 17 ตารางที่ 4) ตามขั้นตอนต่อไปนี้



ภาพที่ 17 แสดงโครงสร้างของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน ตำแหน่งตัดจำเพาะทั้ง 7 ตำแหน่ง ที่ใช้ศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน ชนิดของไพรเมอร์และขนาดของชิ้นส่วน ดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR และขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.1.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอที่ตำแหน่ง 5' ε-*Hinc*II

4.1.1.1 เตรียม microtube ขนาด 0.1 มล.

4.1.1.2 เติมสารต่างๆ ดังนี้

- 10X PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
- 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$	1	ไมโครลิตร
- dNTP mixture (200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- primer SF7 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- primer SF8 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	17	ไมโครลิตร
- DNA polymerase (Biotools) (1ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
- ดีเอนเอตัวอย่าง	1	ไมโครลิตร

4.1.1.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.1.1.4 วางหลอดลงในเครื่อง PERKIN ELMER GeneAmp PCR sytem 9600 (PCR 9600) ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR คือ

- 94 องศาเซลเซียส 3 นาที
- 94 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 65 องศาเซลเซียส 1.5 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ
- 10 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นเก็บดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์และดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบินทั้ง 7 ตำแหน่ง

ตำแหน่ง	primer	ลำดับเบส 5′ → 3′
5′ ε-*Hinc*II	SF7*	GGCACATGGATCGAATTGAA
	SF8**	ACCATGATGCCAGGCCTGAG
$^{G}\gamma$-*Hind*III	SF3*	GTTTGTGTGTGTGTGAGAGC
	SF4**	TCTTTAGGCATGCGTCAACA
$^{A}\gamma$-*Hind*III	SF5*	TTAACGTCTTCAGCCTACAA
	SF6**	CAATCTGCACACTTGAGGGGC
ψβ-*Hinc*II	SF9*	GGGAACAGAAGTTGAGATAG
	SF10**	CTCTTTTCTTGCAGGATTGC
3′ ψβ-*Hinc*II	SF11*	GCTCCATGAACAAACATTCC
	SF12**	AAGGAGCACCCACTAGCTCA
β-AvaII	YK15*	TCTCTCTGCCTATTGGTCTA
	G8**	GCTTGGACTCAGAATAATCC
3′ β-*Bam*HI	SF1*	GCCCACATCACCAAGGCAAT
	SF2**	GCTCTACGGATGTGTGAGAT

หมายเหตุ * = upstream primer

** = downstream primer

4.1.1.5 ตรวจผลการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis จะได้ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ที่มีขนาด 1068 คู่เบส ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอที่ตำแหน่ง $^{G}\gamma$-*Hind*III

4.1.2.1 เตรียม microtube ขนาด 0.1 มล.

4.1.2.2 เติมสารต่างๆ ดังนี้

- 10X PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
- 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$	1	ไมโครลิตร
- dNTP mixture (200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- primer SF3 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- primer SF4 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	16.5	ไมโครลิตร
- DNA polymerase (Biotools) (1ยูนิต/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- ดีเอนเอตัวอย่าง	1	ไมโครลิตร

4.1.2.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.1.2.4 วางหลอดลงในเครื่อง PERKIN ELMER CETUS DNA Thermal Cycle 480 (PCR 480) ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR คือ

- 94 องศาเซลเซียส 3 นาที
- 94 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 65 องศาเซลเซียส 1.5 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ
- 10 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นเก็บ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ไว้ได้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

4.1.2.5 ตรวจผลการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis จะได้ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ที่มีขนาด 1124 คู่เบส ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.1.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอที่ตำแหน่ง $^{A}\gamma$-*Hind*III

4.1.3.1 เตรียม microtube ขนาด 0.1 มล.

4.1.3.2 เติมสารต่างๆ ดังนี้

- 10X PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
- 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$	1	ไมโครลิตร
- dNTP mixture (200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- primer SF5 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- primer SF6 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	16.5	ไมโครลิตร
- DNA polymerase (Biotools) (1ยูนิต/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร

- ดีเอนเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร

4.1.3.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.1.3.4 วางหลอดลงในเครื่อง PCR 480 ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR เช่นเดียวกับในข้อ 4.1.2.4 หลังจากนั้นเก็บ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ไว้ได้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

4.1.3.5 ตรวจผลการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis จะได้ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ที่มีขนาด 992 คู่เบส ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.1.4 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอที่ตำแหน่ง ψβ-*Hinc*II

4.1.4.1 เตรียม microtube ขนาด 0.1 มล.

4.1.4.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร
- 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 1 ไมโครลิตร
- dNTP mixture (200 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตร
- primer SF9 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร
- primer SF10 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 16.5 ไมโครลิตร
- DNA polymerase (Biotools) (1ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร
- ดีเอนเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร

4.1.4.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.1.4.4 วางหลอดลงในเครื่อง PCR 9600 ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR คือ

- 94 องศาเซลเซียส 2 นาที
- 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นจำนวน 30 รอบ
- 10 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นเก็บ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ไว้ได้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

4.1.4.5 ตรวจผลการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis จะได้ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ที่มีขนาด 1009 คู่เบส ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.1.5 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอที่ตำแหน่ง 3'ψβ-*Hinc*II

4.1.5.1 เตรียม microtube ขนาด 0.1 มล.

4.1.5.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- 10X PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
- 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$	1	ไมโครลิตร
- dNTP mixture (200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- primer SF11 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- primer SF12 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	17	ไมโครลิตร
- DNA polymerase (Biotools) (1ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
- ดีเอนเอตัวอย่าง	1	ไมโครลิตร

4.1.5.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.1.5.4 วางหลอดลงในเครื่อง PCR 9600 ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR เช่นเดียวกับข้อ 4.1.4.4 หลังจากนั้นเก็บ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ไว้ได้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

4.1.5.5 ตรวจผลการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis จะได้ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ที่มีขนาด 980 คู่เบส ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.1.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอที่ตำแหน่ง β-*Ava*II

4.1.6.1 เตรียม microtube ขนาด 0.1 มล.

4.1.6.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- 10X PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
- 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$	2.5	ไมโครลิตร
- dNTP mixture (200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- primer YK15 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- primer G8 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	16	ไมโครลิตร
- *Taq* polymerase (Promega) (1ยูนิต/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- ดีเอนเอตัวอย่าง	1	ไมโครลิตร

4.1.6.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.1.6.4 วางหลอดลงในเครื่อง PCR 9600 ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR เช่นเดียวกับข้อ 4.1.4.4 หลังจากนั้นเก็บ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ไว้ได้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

4.1.6.5 ตรวจผลการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis จะได้ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ที่มีขนาด 1060 คู่เบส ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.1.7 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอที่ตำแหน่ง 3′β-*BamH*I

4.1.7.1 เตรียม microtube ขนาด 0.1 มล.

4.1.7.2 เติมสารต่างๆ ดังนี้

- 10X PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
- 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$	2.5	ไมโครลิตร
- dNTP mixture (200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
- primer SF1 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- primer SF2 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	16	ไมโครลิตร
- *Taq* polymerase (Promega) (1ยูนิต/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
- ดีเอนเอตัวอย่าง	1	ไมโครลิตร

4.1.7.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.1.7.4 วางหลอดลงในเครื่อง PCR 9600 ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR เช่นเดียวกับข้อ 4.1.4.4 หลังจากนั้นเก็บ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ไว้ได้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

4.1.7.5 ตรวจผลการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis จะได้ ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ ที่มีขนาด 1520 คู่เบส ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.2 ตัดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วย restriction enzyme ตามขั้นตอนต่อไปนี้

4.2.1 ตำแหน่ง 5′ε-*Hinc*II

4.2.1.1 เตรียม microtube ขนาด 1.5 มล.

4.2.1.2 เติมสารต่างๆ ดังนี้

- ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้	10	ไมโครลิตร
- 10X buffer B	1.5	ไมโครลิตร
- *Hinc*II (10ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.1	ไมโครลิตร

- spermidine (100 มิลลิโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3.3 ไมโครลิตร

4.2.1.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.2.1.4 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

4.2.1.5 ตรวจผลการตัดดีเอนเอด้วย restriction enzyme *Hinc*II ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่ทำการศึกษาจะมีขนาด 528 คู่เบส และ 540 คู่เบส

4.2.2 ตำแหน่ง $^{G}\gamma$-*Hind*III

4.2.2.1 เตรียม microtube ขนาด 1.5 มล.

4.2.2.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ 10 ไมโครลิตร
- 10X buffer B 1.5 ไมโครลิตร
- *Hind*III (10 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร
- spermidine (100 มิลลิโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3.3 ไมโครลิตร

4.2.2.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.2.2.4 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

4.2.2.5 ตรวจผลการตัดดีเอนเอด้วย restriction enzyme *Hind*III ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่ทำการศึกษาจะมีขนาด 230 คู่เบส และ 679 คู่เบส

4.2.3 ตำแหน่ง $^{A}\gamma$-*Hind*III

4.2.3.1 เตรียม microtube ขนาด 1.5 มล.

3.3.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ 10 ไมโครลิตร
- 10X buffer B 1.5 ไมโครลิตร
- *Hind*III (10ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร
- spermidine (100 มิลลิโมลาร์) 0.1 ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3.3 ไมโครลิตร

4.2.3.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.2.3.4 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

4.2.3.5 ตรวจผลการตัดดีเอนเอด้วย restriction enzyme *Hind*III ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่ทำการศึกษาจะมีขนาด 166 คู่เบส และ 681 คู่เบส

4.2.4 ตำแหน่ง ψβ-*Hinc*II

4.2.4.1 เตรียม microtube ขนาด 1.5 มล.

4.2.4.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้	10	ไมโครลิตร
- 10X buffer B	1.5	ไมโครลิตร
- *Hinc*II (10 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.1	ไมโครลิตร
- spermidine (100 มิลลิโมลาร์)	0.1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	3.3	ไมโครลิตร

4.2.4.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.2.4.4 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

4.2.4.5 ตรวจผลการตัดดีเอนเอด้วย restriction enzyme *Hinc*II ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่ทำการศึกษาจะมีขนาด 360 คู่เบส และ 649 คู่เบส

4.2.5 ตำแหน่ง 3′ψβ-*Hinc*II

4.2.5.1 เตรียม microtube ขนาด 1.5 มล.

4.2.5.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้	10	ไมโครลิตร
- 10X buffer B	1.5	ไมโครลิตร
- *Hinc*II (10 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.1	ไมโครลิตร
- spermidine (100 มิลลิโมลาร์)	0.1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	3.3	ไมโครลิตร

4.2.5.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.2.5.4นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

4.2.5.5 ตรวจผลการตัดดีเอนเอด้วย restriction enzyme *Hinc*II ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่ทำการศึกษาจะมีขนาด 409 คู่เบส และ 571 คู่เบส

4.2.6 ตำแหน่ง β-*Ava*II

4.2.6.1 เตรียม microtube ขนาด 1.5 มล.

4.2.6.2 เติมสารต่างๆ ดังนี้

- ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้	10	ไมโครลิตร
- 10X buffer C	1.5	ไมโครลิตร
- *Ava*II (10 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.1	ไมโครลิตร
- spermidine (100 มิลลิโมลาร์)	0.1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	3.3	ไมโครลิตร

4.2.6.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.2.6.4 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

4.2.6.5 ตรวจผลการตัดดีเอนเอด้วย restriction enzyme *Ava*II ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่ทำการศึกษาจะมีขนาด 214 คู่เบส และ 790 คู่เบส

4.2.7 ตำแหน่ง 3′β-*BamH*I

4.2.7.1 เตรียม microtube ขนาด 1.5 มล.

4.2.7.2 เติมสารต่างๆ ดังนี้

- ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้	10	ไมโครลิตร
- 10X buffer E	1.5	ไมโครลิตร
- *BamH*I (10ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.1	ไมโครลิตร
- spermidine (100 มิลลิโมลาร์)	0.1	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	3.3	ไมโครลิตร

4.2.7.3 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

4.2.7.4 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

4.2.7.5 ตรวจผลการตัดดีเอนเอด้วย restriction enzyme *BamH*I ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ถูกตัด ณ ตำแหน่งที่ทำการศึกษาจะมีขนาด 292 คู่เบส และ 1228 คู่เบส

4.3 นำเอาผลการตัดของ restriction enzyme ทั้ง 7 ตำแหน่งมาจัดรวมกันเป็นลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์และดีเอนเอแฟรมเวิร์ค

5. การศึกษารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบิน

5.1 การศึกษายีนแอลฟาโกลบินด้วย Southern blot hybridization

5.1.1 การย่อย genomic DNA ด้วย restriction enzyme *BamHI*

5.1.1.1 ผสมสารละลายดีเอนเอประมาณ 250 ไมโครลิตร 10X buffer B 40 ไมโครลิตร spermidine 4.5 ไมโครลิตร restriction enzyme *Bam*HI 1.5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าด้วยกันนำไปใส่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

5.1.1.2 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.5 โมลาร์ EDTA 8 ไมโครลิตร และ 3 โมลาร์ sodium acetate 40 ไมโครลิตร

5.1.1.3 ตกตะกอนดีเอนเอโดยเติม 100 % Ethanol 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำไปแช่ในตู้เย็น -75 องศาเซลเซียส 20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่น 12000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที

5.1.1.4 ดูด ethanol ออกให้หมด ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

5.1.1.5 ละลายดีเอนเอด้วยน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร

5.1.2 Southern blot electrophoresis

5.1.2.1 เตรียม 0.8% agarose Gel ขนาด 14 X 21 cm หนา ประมาณ 0.8 cm ทิ้งไว้ให้แข็งตัวดี นำไปแช่ไว้ในกล่องใส่ TAE-buffer

5.1.2.2 ผสมดีเอนเอที่เตรียมไว้กับ 6X loading dye 3 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมเจล เปรียบเทียบกับ ดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบขนาด (λ-DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Hind*III)

5.1.2.3 ปล่อยกระแสไฟฟ้า 150 มิลลิแอมแปร์ เพื่อดันดีเอนเอให้เข้าสู่เจล หลังจากนั้นลดกระแสไฟลงเหลือประมาณ 35-40 มิลลิแอมแปร์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 ชั่วโมง หลัง

จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide 10 นาที ส่องดูภายใต้แสง UV วัดระยะทางดีเอนเอมาตรฐานและถ่ายภาพเก็บไว้

5.1.2.4 เตรียมกระดาษกรอง (3M) อย่างหนา 3 แผ่น วางลงบนกระจกที่วางพาดอยู่บนกล่องใส่สารละลาย 20X SSC ให้ปลายกระดาษจุ่มอยู่ในสารละลาย รอให้สารละลายซึมขึ้นมาเต็มแผ่น

5.1.2.5 นำเจลไปเตรียมสำหรับการถ่ายดีเอนเอสู่ nylon membrane โดย แช่ลงใน partial depurination buffer 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง denaturing solution 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และ neutralization solution 20 นาที 2 ครั้ง

5.1.2.6 ตัดแผ่น nitrocellulose nylon membrane กะให้สามารถวางบนแผ่นเจลแล้ว คลุมพื้นที่เจลส่วนที่มีดีเอนเอชิ้นที่ต้องการได้ โดยดูจากระยะของดีเอนเอมาตรฐานที่วัดไว้ คือประมาณตั้งแต่ชิ้นที่มีขนาด 4.2 - 23.1 กิโลเบส (DNA marker แถบที่ 1-4) แช่แผ่น membrane ไว้ในน้ำกลั่น อย่างน้อย 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ไว้ในสารละลาย 20X SSC อีกอย่างน้อย 5 นาที

5.1.2.7 วางแผ่นเจลลงบนกระดาษกรองที่ปลายแช่อยู่ในสารละลาย 20X SSC วางแผ่น nitrocellulose nylon membrane ที่ตัดไว้ลงบนเจล กะตำแหน่งให้คลุมดีเอนเอชิ้นที่ศึกษา (ตามข้อ 6)

5.1.2.8 วางกระดาษกรองอย่างหนา และกระดาษซับลงบนแผ่น membrane ให้มากพอที่จะดูดซับบัฟเฟอร์ได้ (สูงประมาณ 15 ซม.) วางน้ำหนักทับลงบนกระดาษซับ ทิ้งไว้ 1 คืน

5.1.2.9 ดีเอนเอจะถูกเคลื่อนย้ายจากเจลไปอยู่บนแผ่น membrane หลังจากนั้นนำแผ่น membrane ไปอบในตู้อบ 80 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอนเอยึดติดกับแผ่น membrane เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

5.1.3 Plasmid Extraction

5.1.3.1 เลี้ยงเชื้อ *E. coli* YF203 ที่มี α-probe plasmid ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ประมาณ 1 วัน

5.1.3.2 นำอาหารไปปั่นแยกเอาเฉพาะตะกอนเซลล์ ดูดอาหารทิ้งไปให้หมด เติม TEG Solution 80 ไมโครลิตร เขย่าแรงๆ ด้วยเครื่อง vortex

5.1.3.3 เติม 0.2 M NaOH ที่ละลายใน 1% SDS 200 µl กลับหลอดไปมา แช่ลงในน้ำแข็ง 5 นาที

5.1.3.4 เติม 5 โมลาร์ KOAC pH 5.2 150 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา แช่ลงในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่น 8000 รอบ/นาที 5 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายใส่หลอดใหม่

5.1.3.5 เติม phenol และ chloroform อย่างละ 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่น 10000 รอบ/นาที 5 นาที ดูดเอาสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่

5.1.3.6 ตกตะกอน DNA probe โดยเติม 5 M NaOAC 50 ไมโครลิตร และ 100% ethanol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำไปแช่ในตู้เย็น - 75 องศาเซลเซียส 20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่น 12000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที

5.1.3.7 ดูด ethanol ออกให้หมด ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

5.1.3.8 ละลายดีเอนเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร

5.1.3.9 นำไปตรวจสอบความเข้มข้น โดย 1.0% agarose mini gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 และ 0.05 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)

5.1.3.10 ตัดดีเอนเอด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI แช่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

5.1.3.11 เติม 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร RNase A 5 ไมโครลิตร แช่ไว้ในอ่างน้ำอีกประมาณ 45 นาที

5.1.3.12 เอามาวิ่งในกระแสไฟฟ้า โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจดู RNA เปรียบเทียนกับดีเอนเอมาตรฐาน โดยไม่ควรมีแถบของ RNA

5.1.3.13 เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร และเติม phenol และ chloroform อย่างละ 100 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่น 10000 รอบ/นาที 5 นาที

5.1.3.14 แยกเอาสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม 3 โมลาร์ NaOAc 20 ไมโครลิตร และ 100 % Ethanol นำไปแช่ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -75 เซลเซียส 20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่น 12000 รอบ/นาที ที่ 4 เซลเซียส 15 นาที

5.1.3.15 ดูดเอาสารละลายทิ้งไป ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

5.1.3.16 ละลาย plasmid ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 ไมโครลิตร

5.1.4 Probe Labeling

5.1.4.1 α-probe 16 ไมโครลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วแช่ลงในน้ำอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทันที นาน 5 นาที

5.1.4.2 เติม hexanucleotide 2 ไมโครลิตร dNTPs 2 ไมโครลิตร และ klenow enzyme 1 ไมโครลิตร แช่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 คืน

5.1.4.3 หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M EDTA 2 ไมโครลิตร 4 M LiCl 2 ไมโครลิตร และ 100% ethanol 100 ไมโครลิตร นำไปแช่ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -75 องศาเซลเซียส 20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่น 12000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที

5.1.4.4 ดูดเอาสารละลายทิ้งไป ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

5.1.4.5 ละลาย plasmid ที่ได้ด้วย TE buffer 50 ไมโครลิตร

5.1.5 Hybridization and Color Developing

5.1.5.1 เอา nitrocellulose nylon membrane ที่มีดีเอนเอใส่ลงในถุงพลาสติก เติม prehybridization buffer ลงไป 30 มล. รีดอากาศออกจากถุงแล้วปิดถุงให้สนิท ใส่ไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

5.1.5.2 ต้ม probe ในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 5 นาที หลังจากนั้นแช่ลงในน้ำอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ทันที อย่างน้อย 5 นาที

5.1.5.3 เท prehybrization buffer ในถุงที่ใส่ nylon membrane ทิ้งไป

5.1.5.4 ผสม prehybrization buffer กับ probe 10 ไมโครลิตร เทลงในถุงพลาสติกที่ใส่ nylon membrane ไว้ รีดอากาศออกจากถุงให้มากที่สุด และปิดถุงให้สนิทให้มีพื้นที่น้อยที่สุด ใส่ไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 1 คืน

5.1.5.5 นำแผ่น nylon membrane ออกมาจากถุง ล้างด้วย washing buffer 1 2 ครั้งครั้งละ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างด้วย washing buffer 2 อีก 2 ครั้งครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

5.1.5.6 แช่ nylon membrane ลงใน Dig buffer 1 30 วินาที และ Dig buffer 2 30 นาที

5.1.5.7 ผสม Dig buffer 2 20 มล. กับ Dig-antibody 4 ไมโครลิตร เทใส่ถุงที่มี nylon membrane รีดอากาศออก ปิดถุงให้สนิท เขย่าไปมาเบา ๆ 30 นาที

5.1.5.8 ล้าง nylon membrane ด้วย Dig buffer 1 2 ครั้งครั้งละ 15 นาที หลังจากนั้น แช่ลงใน Dig buffer 3 2 นาที

5.1.5.9 เตรียม color developing solution โดยใช้ Dig buffer 3 15 ไมโครลิตร NBT 45 ไมโครลิตร และ X-phosphate 45 ไมโครลิตร เทใส่ถุงที่ใส่ nylon membrane ไว้ รีดอากาศออกให้มากที่สุด นำไปวางไว้ในที่มืด ปฏิกิริยาจะเสร็จสมบูรณ์ใน 12 ชั่วโมง

5.1.5.10 ล้างและเก็บ nylon membrane ไว้ใน Dig buffer 4

5.1.5.11 บันทึกผล โดยดีเอนเอปกติที่ไม่มีการขาดหายไปของดีเอนเอในช่วงของ α-globin gene จะมีขนาด 14 กิโลเบส แต่ถ้ามีการขาดหายไปเป็นช่วงที่มีความยาว 3.7 กิโลเบส หรือ 4.2 กิโลเบส จะเห็นแถบดีเอนเอขนาดประมาณ 10 กิโลเบส และถ้ามีช่วงของดีเอนเอเกินมาจะเห็นแถบดีเอนเอขนาดประมาณ 18 กิโลเบส

5.1.5.12 ถ้าพบ 2 กรณีหลังจะนำเอาดีเอนเอที่เหลือมาทำ Southern blot hybridization อีกครั้ง เพื่อจำแนกชนิดของการขาดหายไป โดยเปลี่ยน restriction enzyme ที่ใช้เป็น *Bgl*II และใช้ 10X buffer D แทน ซึ่งจะทำให้สามารถจำแนกได้เป็น

- ดีเอนเอปกติจะเห็นเป็นแถบของดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 7.4 กิโลเบส และ 12.6 กิโลเบส
- ดีเอนเอที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินเป็นช่วงยาว 3.7 กิโลเบส จะเห็นเป็นแถบของดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 16 กิโลเบส
- ดีเอนเอที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินเป็นช่วงยาว 4.2 กิโลเบส จะเห็นเป็นแถบของดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 7.4 กิโลเบส เพียงแถบเดียว ซึ่งซ้อนทับกับแถบดีเอนเอปกติ แต่เนื่องจากได้มีการตรวจสอบโดยการตัดด้วย restriction enzyme *BamH*I มาแล้วข้างต้น จึงทำให้จำแนกการขาดหายไปที่เกิดขึ้นได้
- ดีเอนเอที่มีช่วงของยีนแอลฟาโกลบินเกินมาขนาด 3.7 กิโลเบส จะเห็นเป็นแถบของดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 3.7 กิโลเบส 7.4 กิโลเบส และ 12.6 กิโลเบส
- ดีเอนเอที่มีช่วงของยีนแอลฟาโกลบินเกินมาขนาด 4.2 กิโลเบส จะเห็นเป็นแถบของดีเอนเอที่มีขนาดประมาณ 7.4 กิโลเบส และ 16 กิโลเบส

5.2 การศึกษาการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (- -SEA)

5.2.1 เลือกดีเอนเอตัวอย่างรายที่ไม่พบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินหลังจากตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot hybridization เนื่องจาก หากยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไปทั้งหมดจะไม่ปรากฏผลบน Southern blot membrane

5.2.2 ตรวจหาการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด SEA ด้วยวิธี PCR โดย

5.2.2.1 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

- 10X Taq buffer	2.5	ไมโครลิตร
- dNTP mixture (200 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
-50% glycerol	5	ไมโครลิตร
- primer A1B (1 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1.5	ไมโครลิตร
- primer A7 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.7	ไมโครลิตร
- primer A9 (15 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1.7	ไมโครลิตร
- sterile deionized water	10.6	ไมโครลิตร
- Taq polymerase (Perkin)	1	ไมโครลิตร
- sample DNA	1	ไมโครลิตร

2.2 เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงให้สารทั้งหมดตกลงสู่ก้นหลอด

2.3 วางหลอดลงในเครื่อง PCR 9600 ใช้โปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR คือ

- 94 องศาเซลเซียส 2 นาที
- 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นจำนวน 30 รอบ
- 10 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นเก็บ amplified DNA ไว้ได้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

3. ตรวจผลการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis
4. บันทึกผล โดยดีเอนเอปกติ จะเห็นแถบดีเอนเอที่มีขนาด 314 bp และดีเอนเอที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด SEA จะเห็นแถบดีเอนเอที่มีขนาด 660 bp

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการศึกษา

จากการศึกษาประชากรไทพวน 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี จำนวน 89 ราย เป็นผู้หญิง 66 ราย ผู้ชาย 23 ราย อายุระหว่าง 14-81 ปี อายุเฉลี่ย 56.2 ปี

2. กลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย จำนวน 74 ราย เป็นผู้หญิง 49 ราย ผู้ชาย 25 ราย อายุระหว่าง 7-80 ปี อายุเฉลี่ย 55.9 ปี

3. กลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี จำนวน 69 ราย เป็นผู้หญิง 50 ราย ผู้ชาย 19 ราย อายุระหว่าง 18-81 ปี อายุเฉลี่ย 54.6 ปี

แบ่งผลการศึกษาออกเป็น 3 ตอน คือ

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน โดยแบ่งเป็น

2.1 ผลการศึกษา 3′-haplotype ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน หรือ β^{E}-globin gene framework

2.2 ผลการศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน

ตอนที่ 3 ผลการศึกษารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน

จากการศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate haemoglobin electrophoresis (ภาพที่ 18) พบว่าชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี จำนวน 89 ราย มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น A_2A หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^A/β^A จำนวน 74 ราย มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EA หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^E/β^A จำนวน 14 ราย และ มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EE หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^E/β^E จำนวน 1 ราย คิดเป็นอุบัติการณ์ฮีโมโกลบินอี (%HbE) เท่ากับ 16.85% และมีความถี่ยีนบีตาอีโกลบิน ($f(\beta^E)$) เท่ากับ 0.090

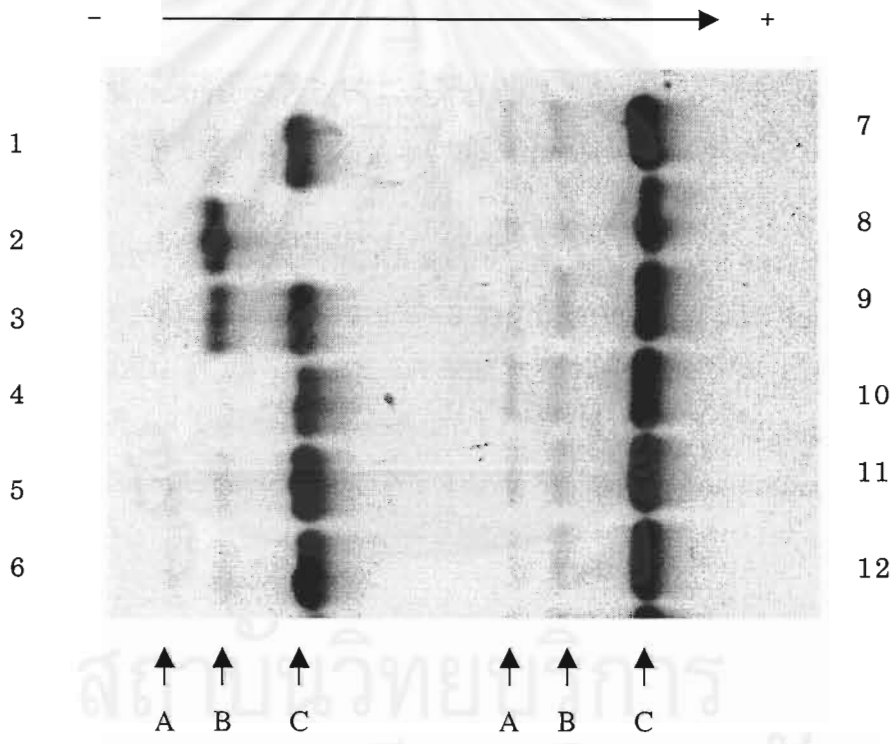
ชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย จำนวน 74 ราย มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น A_2A หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^A/β^A จำนวน 43 ราย มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EA หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^E/β^A จำนวน 28 ราย และ มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EE หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^E/β^E จำนวน 3 ราย คิดเป็นอุบัติการณ์ฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 41.85% และมีความถี่ยีนบีตาอีโกลบินเท่ากับ 0.230

ชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี จำนวน 69 ราย มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น A_2A หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^A/β^A จำนวน 61 ราย มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EA หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตา โกลบินเป็นแบบ β^E/β^A จำนวน 7 ราย และ มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EE หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^E/β^E จำนวน 1 ราย คิดเป็นอุบัติการณ์ฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 11.50% และมีความถี่ยีนบีตาอีโกลบินเท่ากับ 0.065

รวมชาวไทพวนทั้ง 3 กลุ่ม 232 ราย มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น A_2A หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^A/β^A จำนวน 178 ราย มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EA หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^E/β^A จำนวน 49 ราย และ มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EE หรือมีจีโนไทป์ของยีนบีตาโกลบินเป็นแบบ β^E/β^E จำนวน 5 ราย คิดเป็นอุบัติการณ์ฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 23.28% และมีความถี่ยีนบีตาอีโกลบินเท่ากับ 0.127 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

ที่ตั้งกลุ่มประชากร	β-globin gene genotype			total no. of individuals	% Hb E	f (β^E)
	β^A/β^A	β^E/β^A	β^E/β^E			
อ. บ้านหมี่ จ.ลพบุรี	74	14	1	89	16.85	0.090
อ.เชียงคาน จ.เลย	43	28	3	74	41.85	0.230
อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี	61	7	1	69	11.50	0.065
รวม	178	49	5	232	23.28	0.127



ภาพที่ 18 แสดงผลการศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis (TBE buffer, pH8.6) A เป็นตำแหน่งจุดเริ่มต้นของฮีโมโกลบิน B เป็นตำแหน่งของ HbE และ HbA_2 C เป็นตำแหน่งของ HbA ตัวอย่างที่ 1 4-12 เป็นตัวอย่างที่มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น A_2A ตัวอย่างที่ 2 เป็นตัวอย่างที่มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EE และ ตัวอย่างที่ 3 เป็นตัวอย่างที่มีชนิดของฮีโมโกลบินเป็น EA

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน

2.1 ผลการศึกษา 3′-haplotype ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน หรือ β^E-globin gene framework (β^E-FW)

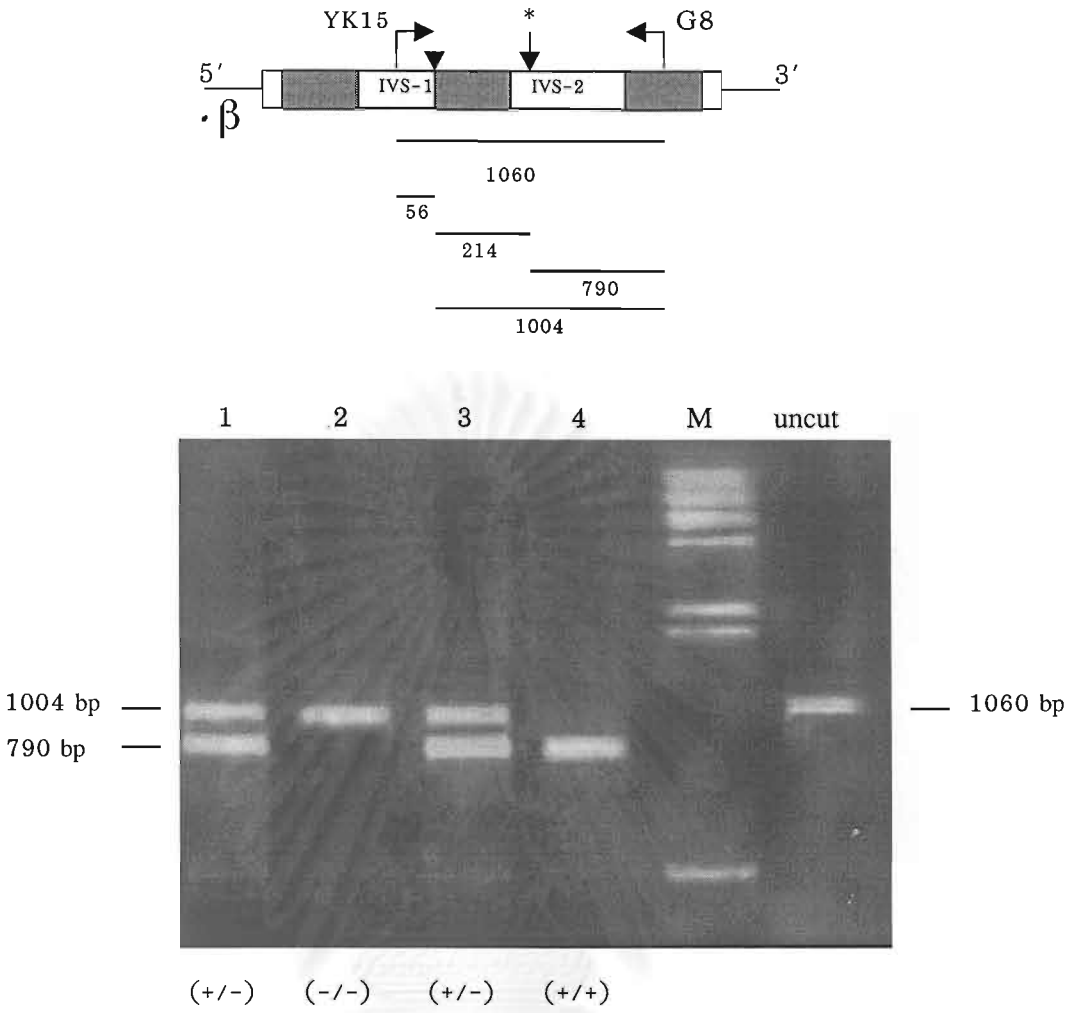
จากการศึกษา β^E-FW ซึ่งเป็นโพลิมอร์ฟิสม 2 ตำแหน่ง คือ β-*Ava*II และ 3′β-*Bam*HI โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอนเอบริเวณดังกล่าวด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังแสดงในภาพที่ 19 และ 20 จากนั้นนำผลการศึกษาที่ได้มาจัดเฟรมเวิร์คโดยจัดได้เป็น 3 รูปแบบคือ FW1 (*Ava*II + *Bam*HI +) FW2 (*Ava*II + *Bam*HI -) และ FW3 (*Ava*II - *Bam*HI +) ผลการศึกษาในตัวแทนชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี พบผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous β^E (β^E/β^E) 1 ราย มีลักษณะ FW เป็น heterozygous FW1 และ FW2 (FW1/FW2) ส่วนผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous β^E (β^E/β^A) จำนวน 14 ราย พบว่ามีลักษณะ FW เป็น homozygous FW2 (FW2/FW2) จำนวน 5 ราย และ heterozygous FW2 และ FW3 (FW2/FW3) จำนวน 9 ราย

ในตัวแทนชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย พบผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น β^E/β^E จำนวน 3 ราย ทั้ง 3 ราย มีลักษณะ FW เป็น homozygous FW2 ส่วนผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น β^E/β^A จำนวน 28 ราย พบว่ามีลักษณะ FW เป็น heterozygous FW1/FW2 จำนวน 5 ราย heterozygous FW1/FW3 จำนวน 2 ราย homozygous FW2 จำนวน 11 ราย heterozygous FW2/FW3 จำนวน 8 ราย และ homozygous FW3 จำนวน 2 ราย

ในตัวแทนชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี พบผู้ที่มี จีโนไทป์เป็น β^E/β^E จำนวน 1 ราย มีลักษณะ FW เป็น homozygous FW2 ส่วนผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น β^E/β^A จำนวน 7 ราย มีลักษณะ FW เป็น heterozygous FW1/FW2 จำนวน 4 ราย homozygous FW2 จำนวน 1 ราย และ heterozygous FW2/FW3 จำนวน 2 ราย

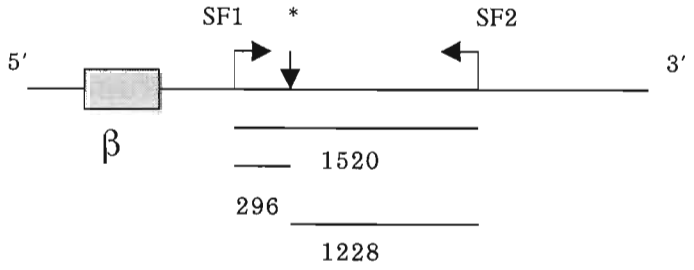
จะเห็นได้ว่าการยืนยันลักษณะ FW ของ β^E โครโมโซมจะทำได้เฉพาะกรณีที่มีจีโนไทป์เป็น β^E/β^E เท่านั้น แต่ในกรณีของจีโนไทป์ β^E/β^A ไม่สามารถจำแนกโครโมโซมที่เป็น β^E ออกจาก β^A ได้นอกจากลักษณะ FW ที่เป็น homozygote อย่างไรก็ตามลักษณะ FW1 เป็นลักษณะที่พบได้ยากมากในบริเวณพื้นที่ที่ทำการศึกษา จึงตั้งสมมติฐานว่าน่าจะเป็นลักษณะที่สัมพันธ์ (linkage) อยู่กับยีนบีตาเอโกลบิน ยกเว้นรายที่เป็น β^E/β^E และมีลักษณะ FW1/FW2 เพียงรายเดียว จึงสรุปลักษณะ β^E-FW ของทั้ง 3 ประชากรได้ตามตารางที่ 6

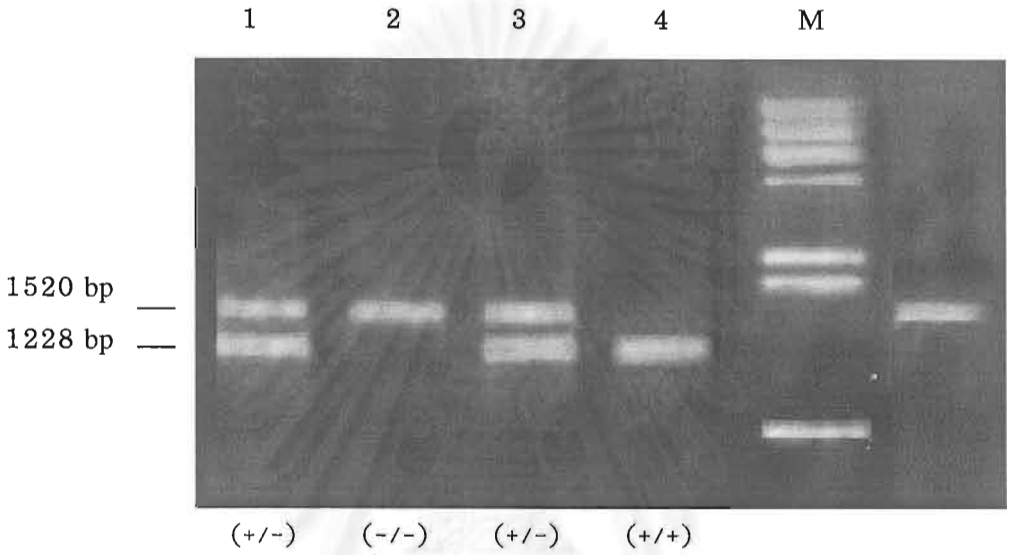
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 19 บน โครงสร้างยีนบีตาโกลบิน แสดงตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Ava*II (▼) ตำแหน่ง β-*Ava*II polymorphism (*) ตำแหน่งไพรเมอร์ YK15 และ G8 ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอนเอ ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอหลังจากการเพิ่มจำนวน (1060 คู่เบส) และหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Ava*II (56 คู่เบส 214 คู่เบส และ 790 คู่เบส)

ล่าง แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis การตัดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ YK15 และ G8 และ ตัดด้วยเอนไซม์ *Ava*II 1 และ 3 เป็นตัวอย่าง heterozygote (+/-) เอนไซม์สามารถตัดโครโมโซมได้เพียงแห่งเดียว 2 เป็นตัวอย่าง homozygote (-/-) เอนไซม์ไม่สามารถตัดโครโมโซมได้ทั้งสองแห่ง 4 เป็นตัวอย่าง homozygote (+/+)เอนไซม์สามารถตัดโครโมโซมได้ทั้งสองแห่ง M เป็น λ-*Hind*III size marker และ uncut เป็นดีเอนเอหลังจากเพิ่มจำนวนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Ava*II





ภาพที่ 20 <u>บน</u> แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ S1 และ SF2 ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอ ตำแหน่ง 3′β-*Bam*HI polymorphism (*) ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ (1520 คู่เบส) และขนาดหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI (290 คู่เบส และ 1228 คู่เบส) <u>ล่าง</u> แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis การตัดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SF1 และ SF2 และ ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI 1 และ 3 เป็นตัวอย่าง heterozygote (+/-) 2 เป็นตัวอย่าง homozygote (-/-) 4 เป็นตัวอย่าง homozygote (+/+) M เป็น λ-*Hind*III size marker และ uncut เป็นดีเอนเอหลังจากเพิ่มจำนวนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาลักษณะดีเอนเอเฟรมเวิร์คของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

	จำนวนโครโมโซม (%)				จำนวนโครโมโซมทั้งหมด
	FW1	FW2	FW3	FW2 / FW3	
อ. บ้านหมี่ จ.ลพบุรี	1 (6.67)	5 (33.33)	-	9 (60.00)	15
อ.เชียงคาน จ.เลย	-	22 (64.71)	4 (11.76)	8 (23.53)	34
อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี	-	7 (77.78)	-	2 (22.22)	9
รวม	1 (1.72)	34 (68.62)	4 (6.90)	19 (32.75)	58

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษา FW ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน (β^{A}-globin) เพื่อเปรียบเทียบ และเพื่อช่วยการวิเคราะห์ผล โดยสุ่มศึกษาในตัวแทนชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี จำนวน 28 โครโมโซม พบว่าเป็นโครโมโซมชนิด FW1 จำนวน 3 โครโมโซม (10.71%) FW2 จำนวน 9 โครโมโซม (32.14%) และ FW3 จำนวน 16 โครโมโซม (57.14%)

สุ่มศึกษาในตัวแทนชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย จำนวน 38 โครโมโซม พบว่าเป็นโครโมโซมชนิด FW1 จำนวน 10 โครโมโซม (26.32%) FW2 จำนวน 10 โครโมโซม (26.32%) และ FW3 จำนวน 18 โครโมโซม (47.36%)

สุ่มศึกษาในตัวแทนชาวไทพวนกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี จำนวน 122 โครโมโซม พบว่าเป็นโครโมโซมชนิด FW1 จำนวน 18 โครโมโซม (14.75%) FW2 จำนวน 48 โครโมโซม (39.34%) และ FW3 จำนวน 56 โครโมโซม (45.90%) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาลักษณะดีเอนเอเฟรมเวิร์คของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวไทพวน ที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

	จำนวนโครโมโซม (%)			จำนวนโครโมโซมทั้งหมด
	FW1	FW2	FW3	
อ. บ้านหมี่ จ.ลพบุรี	3 (10.71)	9 (32.14)	16 (57.14)	28
อ.เชียงคาน จ.เลย	10 (26.32)	10 (26.32)	18 (47.36)	38
อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี	18 (14.75)	48 (39.34)	56 (45.90)	122
รวม	31 (16.49)	67 (35.64)	90 (47.87)	188

ผลการศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของกลุ่มยีนทั้งสองที่ได้นี้ จะถูกนำไปใช้ประกอบการศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินต่อไป

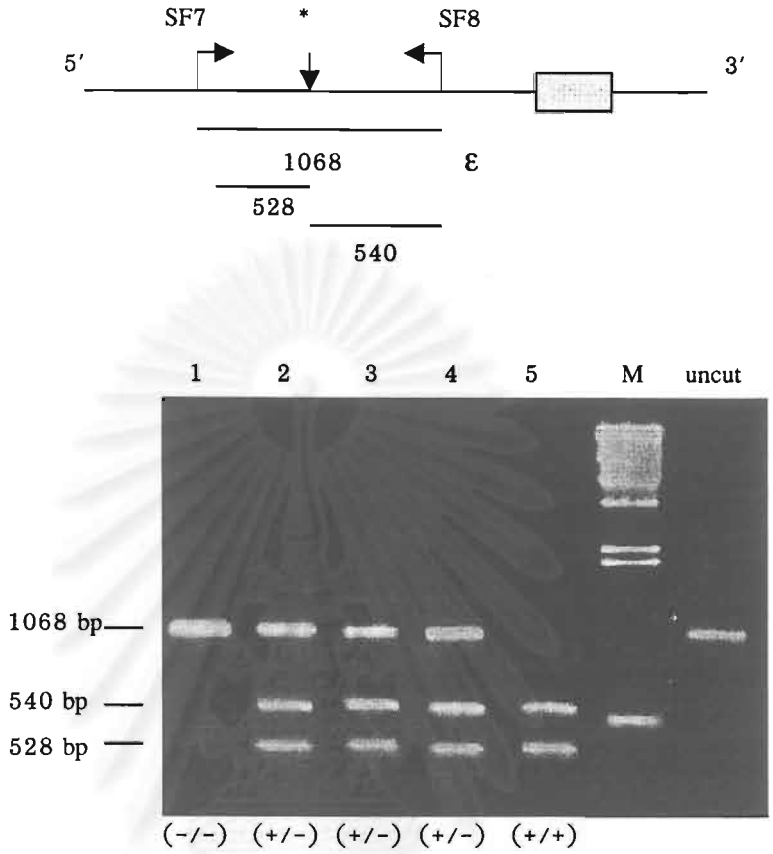
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ผลการศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน

จากการศึกษาลักษณะโพลิมอร์ฟิสมของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ตำแหน่ง ทั้งด้าน 5′-haplotype และ 3′-haplotype ซึ่งประกอบด้วย 5′ε-*Hind*III $^{G}\gamma$-*Hind*III $^{A}\gamma$-*Hind*III ψβ-*Hinc*II 3′ψβ-*Hinc*II β-*Ava*II และ 3′β-*Bam*HI โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณดังกล่าวด้วยไพรเมอร์จำเพาะ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังแสดงในภาพที่ 21-25 จากนั้นนำผลการศึกษาที่ได้มาจัดจำแนกเป็นลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินของโครโมโซมแต่ละแท่ง ซึ่งสามารถจำแนกได้ในกรณีที่มีจีโนไทป์เป็น β^{E}/β^{E} ส่วนกรณี β^{E}/β^{A} นั้นจะจำแนกได้ในกรณีที่โพลิมอร์ฟิสมของแต่ละตำแหน่งทั้ง 7 ตำแหน่งให้ผลเป็น homozygote ไม่น้อยกว่า 6 ตำแหน่ง พบว่าในตัวแทนกลุ่มประชากรไทพวนที่อาศัยอยู่ที่ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี สามารถจำแนกลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินได้ทั้งหมด 11 โครโมโซม เป็นแบบ +----β^{E}+- ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW2 จำนวน 6 โครโมโซม คิดเป็น 54.55% เป็นแบบ -+-++β^{E}+- ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW2 จำนวน 4 โครโมโซม คิดเป็น 36.36% ส่วนอีก 1 โครโมโซมมีลักษณะเป็นแบบ -+--+β^{E}++ ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW1 คิดเป็น 9.09%

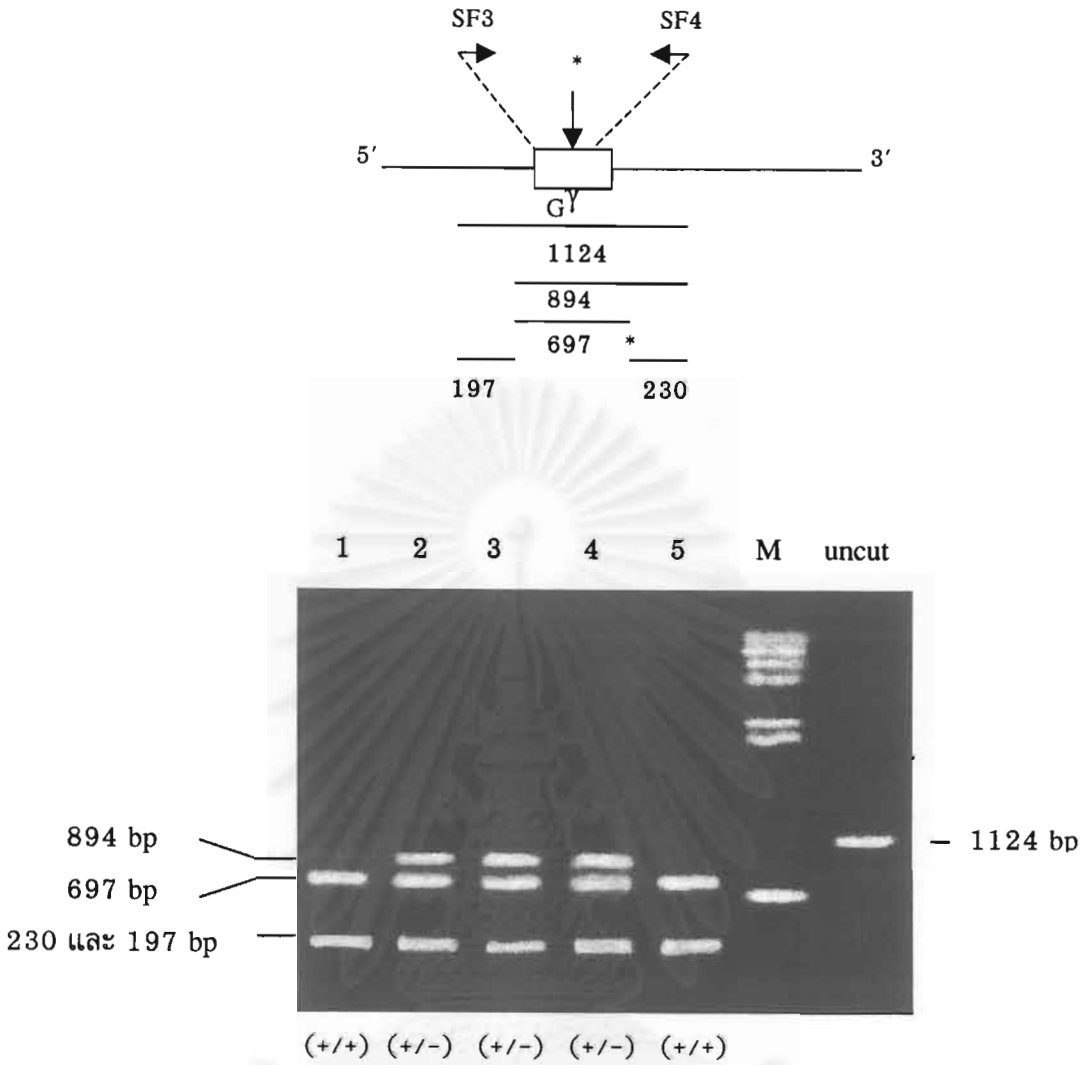
ในตัวแทนกลุ่มประชากรไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย จำแนกลักษณะได้ 13 โครโมโซมเป็นแบบ -+-++β^{E}+- ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW2 จำนวน 5 โครโมโซม คิดเป็น 38.46% เป็นแบบ +----β^{E}+- ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW2 จำนวน 4 โครโมโซม คิดเป็น 30.77% เป็นแบบ +----β^{E}-+ ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW3 จำนวน 3 โครโมโซม คิดเป็น 23.08% ที่เหลืออีก 1 โครโมโซมเป็นแบบ -++-+ β^{E}+- ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW2 คิดเป็น 7.69%

ในตัวแทนกลุ่มประชากรไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานีจำแนกลักษณะได้ 6 โครโมโซมเป็นแบบ -+-++β^{E}+- ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW2 จำนวน 4 โครโมโซม คิดเป็น 66.67% ที่เหลืออีก 1 โครโมโซมเป็นแบบ +----β^{E}+- ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิด FW2 คิดเป็น 33.33% (ตามตารางที่ 8)



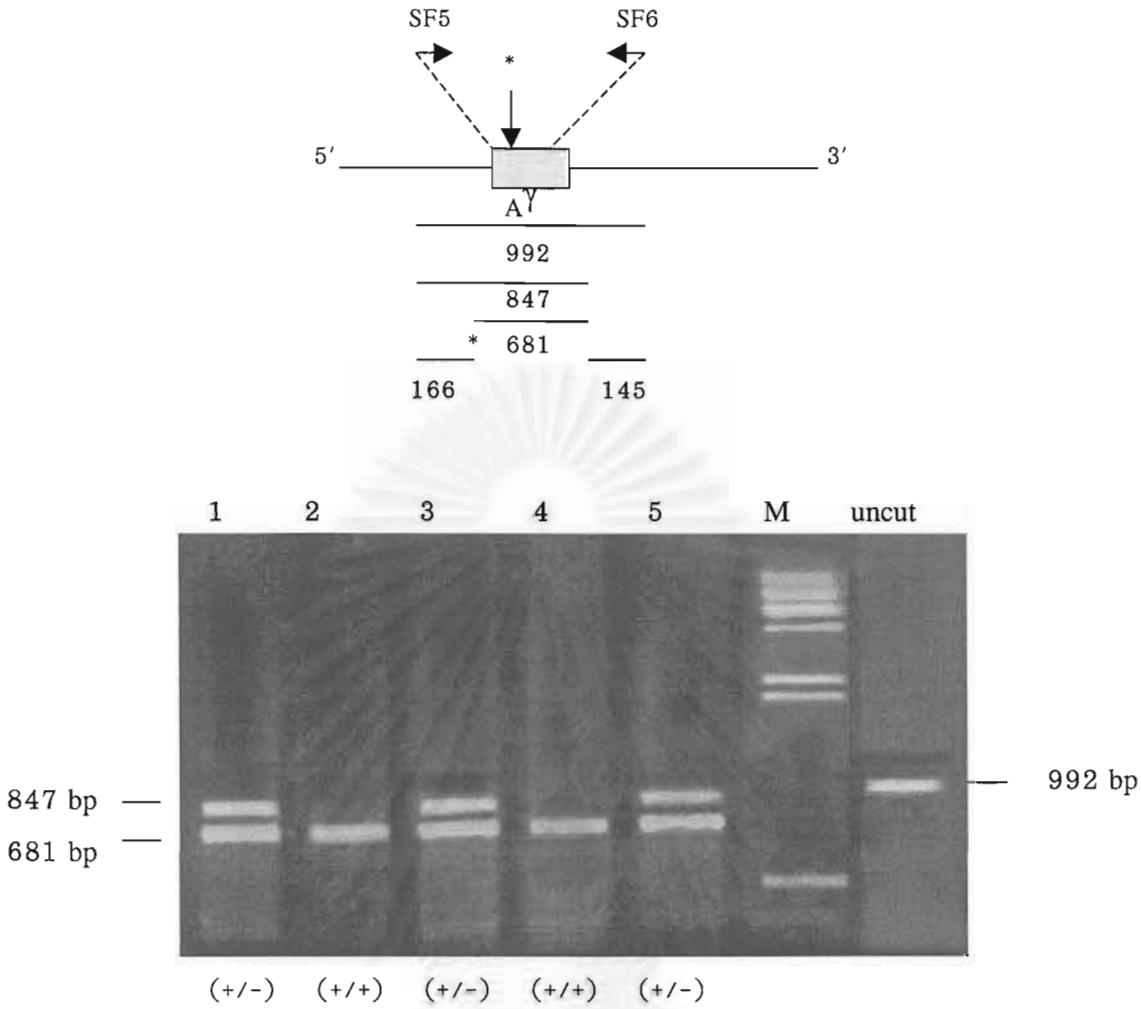
ภาพที่ 21 <u>บน</u> แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ SF7 และ SF8 ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอ ตำแหน่ง 5′ε-*Hinc*II polymorphism (*) ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ (1068 คู่เบส) และขนาดหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II (528 คู่เบส และ 540 คู่เบส)

<u>ล่าง</u> แสดงผล 1.5% agarose gel electrophoresis การตัดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SF7 และ SF8 และ ตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II 1 เป็นตัวอย่าง homozygote (-/-) 2-4 เป็นตัวอย่าง heterozygote (+/-) 5 เป็นตัวอย่าง homozygote (+/+) M เป็น λ-*Hind*III size marker และ uncut เป็นดีเอนเอหลังจากเพิ่มจำนวนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III



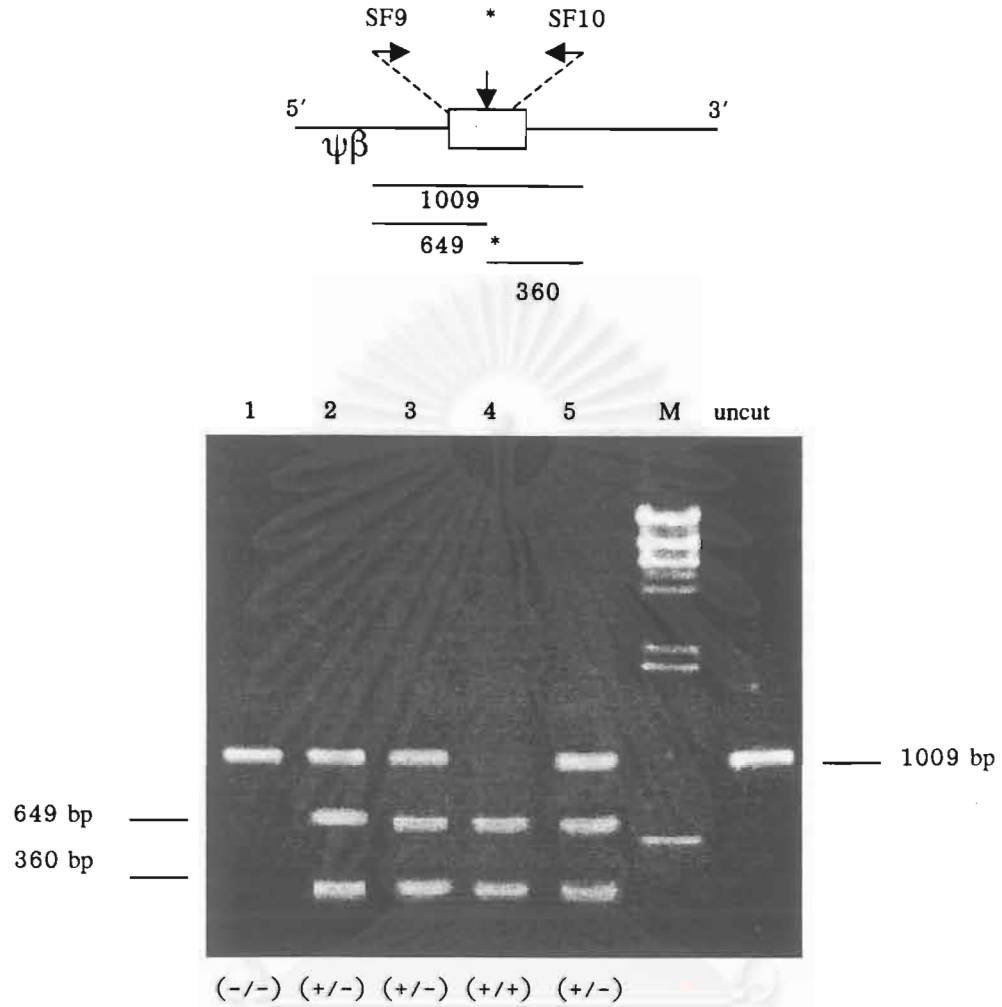
ภาพที่ 22 บน แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ SF3 และ SF4 ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอตำแหน่ง Gγ-*Hind*III polymorphism (*) ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ (1124 คู่เบส) และขนาดหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ถ้าเอนไซม์ตัดดีเอนเอได้ที่ตำแหน่งโพลิเมอร์ฟิสมจะได้ดีเอนเอขนาด 197 697 คู่เบส และ 230 คู่เบส ถ้าเอนไซม์ตัดที่ตำแหน่งโพลิมอร์ฟิสมไม่ได้จะได้ดีเอนเอขนาด 197 คู่เบส และ 894 คู่เบส

ล่าง แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis การตัดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SF3 และ SF4 และ ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III 1 และ 5 เป็นตัวอย่าง homozygote (+/+) 2-4 เป็นตัวอย่าง heterozygote (+/-) M เป็น λ-*Hind*III size marker และ uncut เป็นดีเอนเอหลังจากเพิ่มจำนวนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III



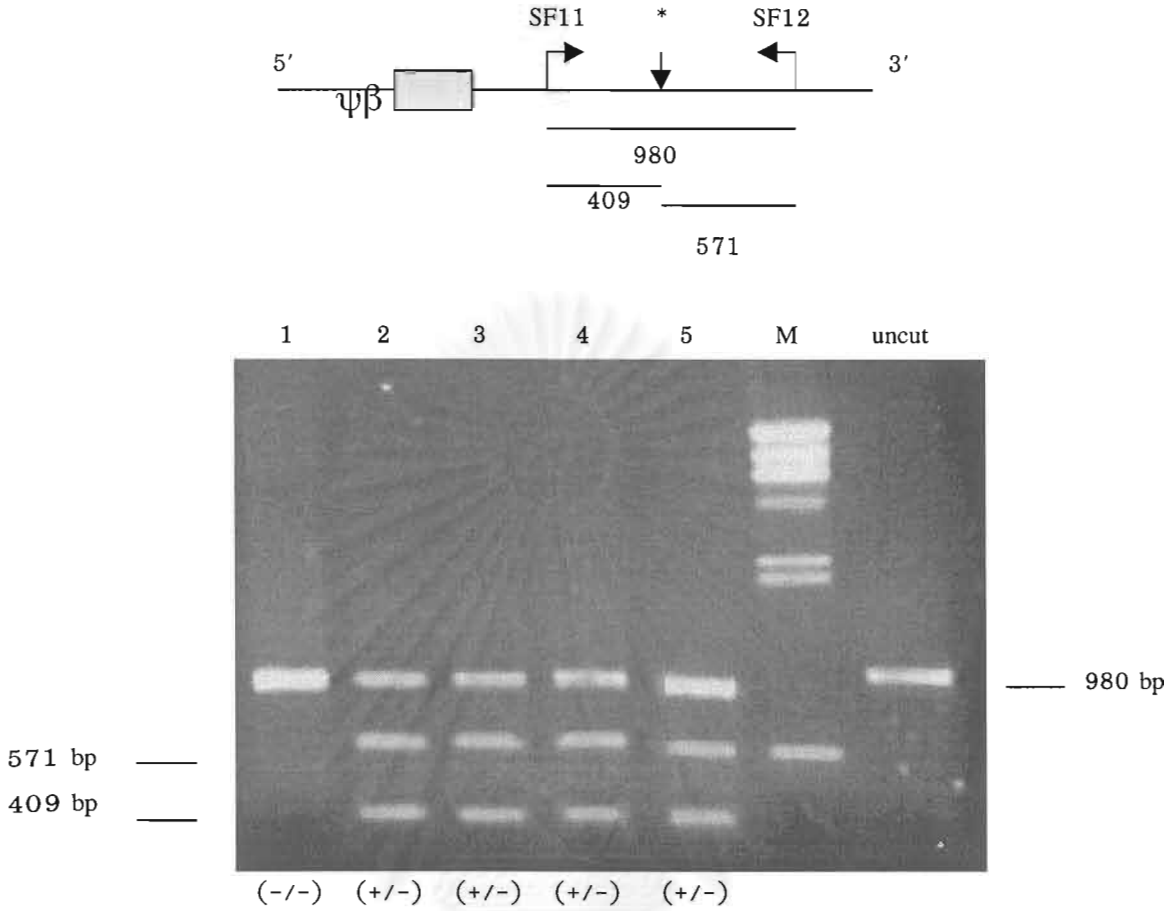
ภาพที่ 23 บน แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ SF5 และ SF6 ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอ ตำแหน่ง Aγ-*Hind*III polymorphism (*) ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ (992 คู่เบส) และขนาดหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III ถ้าเอนไซม์ตัดดีเอนเอได้ที่ตำแหน่งโพลิเมอร์ฟิสมจะได้ดีเอนเอขนาด 145 166 คู่เบส และ 681 คู่เบส ถ้าเอนไซม์ตัดที่ตำแหน่งโพลิมอร์ฟิสมไม่ได้จะได้ดีเอนเอขนาด 145 คู่เบส และ 847 คู่เบส

ล่าง แสดงผล1% agarose gel electrophoresis การตัดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SF5 และ SF6 และ ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III 1 3 และ 5 เป็นตัวอย่าง heterozygote (+/-) 2 และ 4 เป็นตัวอย่าง homozygote (+/+) M เป็น λ-*Hind*III size marker และ uncut เป็นดีเอนเอหลังจากเพิ่มจำนวนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III



ภาพที่ 24 <u>บน</u> แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ SF9 และ SF10 ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอ ตำแหน่ง ψβ-*Hinc*II polymorphism (*) ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ (1009 คู่เบส) และขนาดหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II ได้ดีเอนเอขนาด 649 คู่เบส และ 360 คู่เบส

<u>ล่าง</u> แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis การตัดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SF9 และ SF10 และ ตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II 1 เป็นตัวอย่าง homozygote (-/-) 2 3 และ 5 เป็นตัวอย่าง heterozygote (+/-) 4 เป็นตัวอย่าง homozygote (+/+) M เป็น λ-*Hind*III size marker และ uncut เป็นดีเอนเอหลังจากเพิ่มจำนวนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II



ภาพที่ 25 <u>บน</u> แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ SF11 และ SF12 ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอ ตำแหน่ง 3′ψβ-*Hinc*II polymorphism (*) ขนาดของชิ้นส่วนดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ (980 คู่เบส) และขนาดหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II ได้ดีเอนเอขนาด 409 คู่เบส และ 571 คู่เบส

<u>ล่าง</u> แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis การตัดชิ้นส่วนของดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SF9 และ SF10 และ ตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II 1 เป็นตัวอย่าง homozygote (-/-) 2-4และ 5 เป็นตัวอย่าง heterozygote (+/-) M เป็น λ-*Hind*III size marker และ uncut เป็นดีเอนเอหลังจากเพิ่มจำนวนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบินใน ประชากรชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

β^E -haplotype	FW	จำนวนโครโมโซม (%)						จำนวนโครโมโซมทั้งหมด (%)	
		อ. บ้านหมี่ จ.ลพบุรี		อ.เชียงคาน จ.เลย		อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี			
-+--+ β^E++	1	1	(9.09)	-		-		1	(3.33)
-+-++β^E+-	2	4	(36.36)	5	(38.46)	4	(66.67)	13	(43.33)
+----β^E+-	2	6	(54.55)	4	(30.77)	2	(33.33)	12	(40.00)
-++-+β^E+-	2	-		1	(7.69)	-		1	(3.33)
+----β^E-+	3	-		3	(23.08)	-		3	(10.00)
รวม		11	(100)	13	(100)	6	(100)	30	(100)

นอกจากนี้ยังได้ทำการสุ่มศึกษาลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินของตัวแทนประชากรทั้ง 3 กลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มข้างต้น พบว่าลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์ที่พบส่วนใหญ่เป็นแบบ +----β^A-+ และ แบบ +----β^A+- รวมทั้งรูปแบบอื่น ๆ อีกหลายรูปแบบ ดังตารางที่ 9

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาลักษณะดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบินใน ประชากรชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต. บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

β^A-haplotype	FW	จำนวนโครโมโซม (%)						จำนวนโครโมโซมทั้งหมด (%)	
		อ. บ้านหมี่ จ.ลพบุรี		อ.เชียงคาน จ.เลย		อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี			
+----β^A++	1	2	(6.45)	6	(20.00)	4	(18.18)	12	(14.46)
-+-++β^A++	1	-		-		2	(9.09)	2	(2.41)
-++-+β^A++	1	-		-		1	(4.55)	1	(1.20)
+----β^A+-	2	12	(38.71)	10	(33.33)	4	(18.18)	26	(31.33)
-+-++β^A+-	2	-		-		1	(4.55)	1	(1.20)
-++-+β^A+-	2	-		-		1	(4.55)	1	(1.20)
++-++β^A+-	2	-		-		1	(4.55)	1	(1.20)
-+--+β^A+-	2	-		-		1	(4.55)	1	(1.20)
+----β^A-+	3	13	(48.39)	13	(43.33)	5	(22.73)	33	(39.76)
-+-++β^A-+	3	-		-		1	(4.55)	1	(1.20)
-++-+β^A-+	3	2	(6.45)	-		-		2	(2.41)
-+--+β^A-+	3	-		-		1	(4.55)	1	(1.20)
----+β^A-+	3	-		1	(3.33)	-		1	(1.20)
รวม		31	(100)	30	(100)	22	(100)	83	(100)

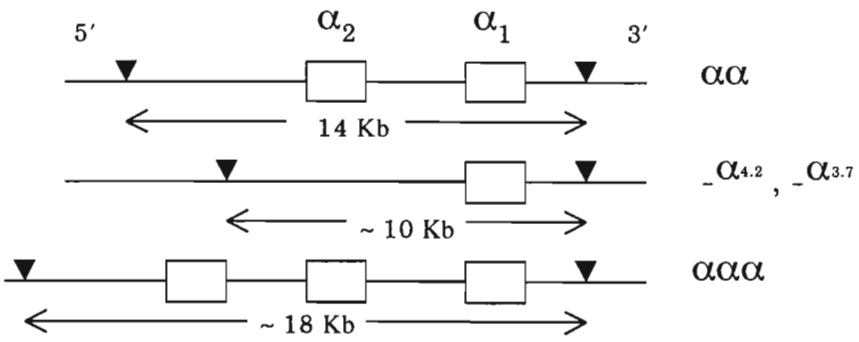
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

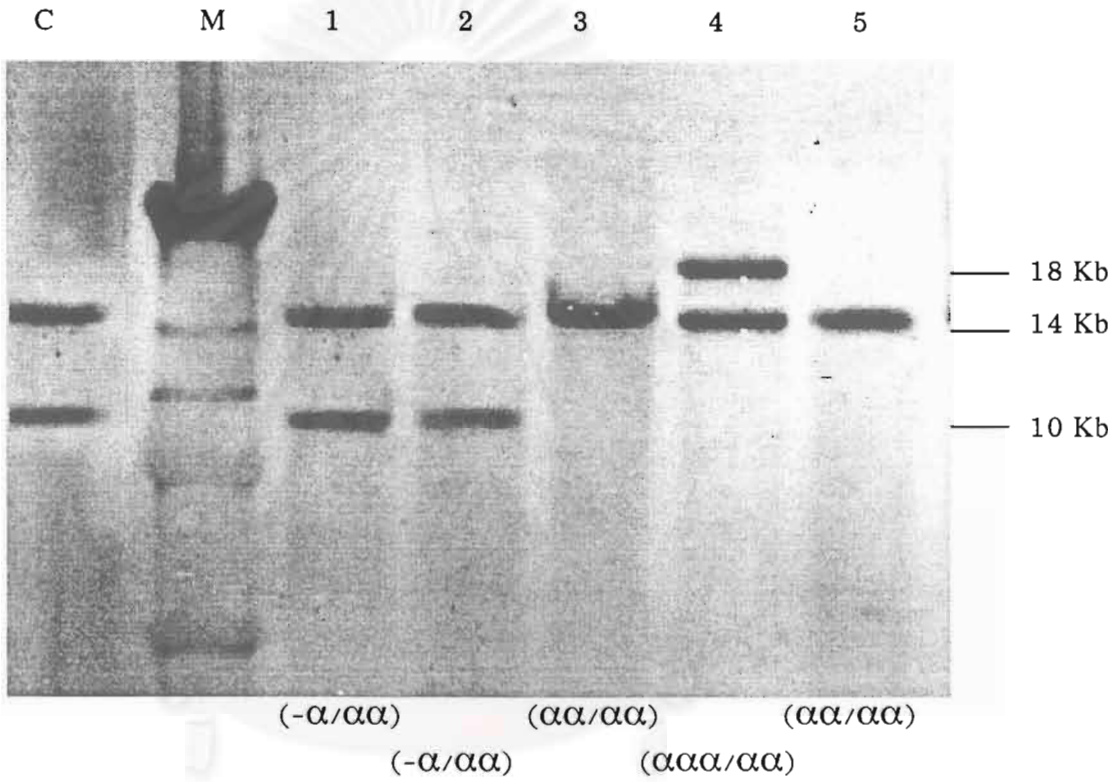
ตอนที่ 3 ผลการศึกษารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบิน

จากการศึกษายีนแอลฟาโกลบินโดยใช้วิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินยีน 1 ยีน ดังแสดงในภาพที่ 26 และ 27 ร่วมกับวิธี PCR ตรวจสอบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินทั้ง 2 ยีนชนิด Southeast Asian (--SEA) ดังแสดงในภาพที่ 28 ทำให้สามารถจัดจีโนไทป์ของยีนแอลฟาโกลบินได้โดยพบว่าในชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ที่ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี อ่านผลได้ 87 รายที่นำมาศึกษา พบจีโนไทป์แบบปกติ (homozygous αα/αα) จำนวน 74 ราย คิดเป็น 85.06% heterozygous $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha^{3.7}$/αα) จำนวน 5 รายคิดเป็น 5.75% heterozygous $-\alpha^{4.2}$ ($-\alpha^{4.2}$/αα) จำนวน 1 รายคิดเป็น 1.15% และ heterozygous --SEA (--SEA/αα) จำนวน 7 รายคิดเป็น 8.05% รวมแล้วคิดเป็นความถี่อัลลีล αα เท่ากับ 0.925, ความถี่อัลลีล $-\alpha^{3.7}$ เท่ากับ 0.029 ความถี่อัลลีล $-\alpha^{4.2}$ เท่ากับ 0.006 และความถี่อัลลีล --SEA เท่ากับ 0.040

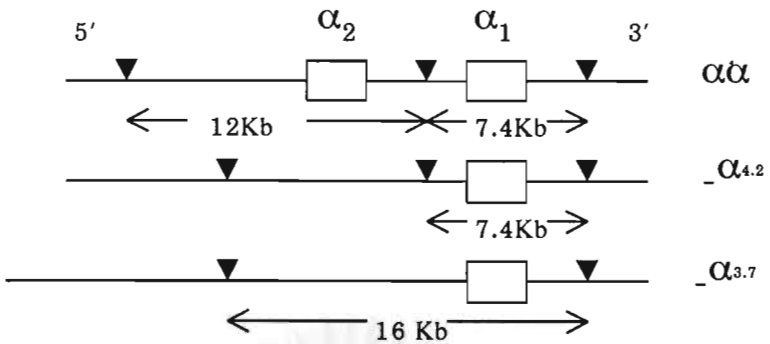
ชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ที่ ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย อ่านผลได้ 66 รายที่นำมาศึกษา พบจีโนไทป์แบบ αα/αα จำนวน 49 ราย คิดเป็น 74.24% heterozygous $-\alpha^{3.7}$ จำนวน 2 รายคิดเป็น 3.03% heterozygous $-\alpha^{4.2}$ จำนวน 1 รายคิดเป็น 1.52% heterozygous --SEA จำนวน 13 รายคิดเป็น 19.70% และ heterozygous ααα/αα จำนวน 1 รายคิดเป็น 1.52% รวมแล้วคิดเป็นความถี่อัลลีล αα เท่ากับ 0.871 ความถี่อัลลีล $-\alpha^{3.7}$ เท่ากับ 0.015 ความถี่อัลลีล $-\alpha^{4.2}$ เท่ากับ 0.008 ความถี่อัลลีล --SEA เท่ากับ 0.098 และความถี่อัลลีล ααα เท่ากับ 0.008

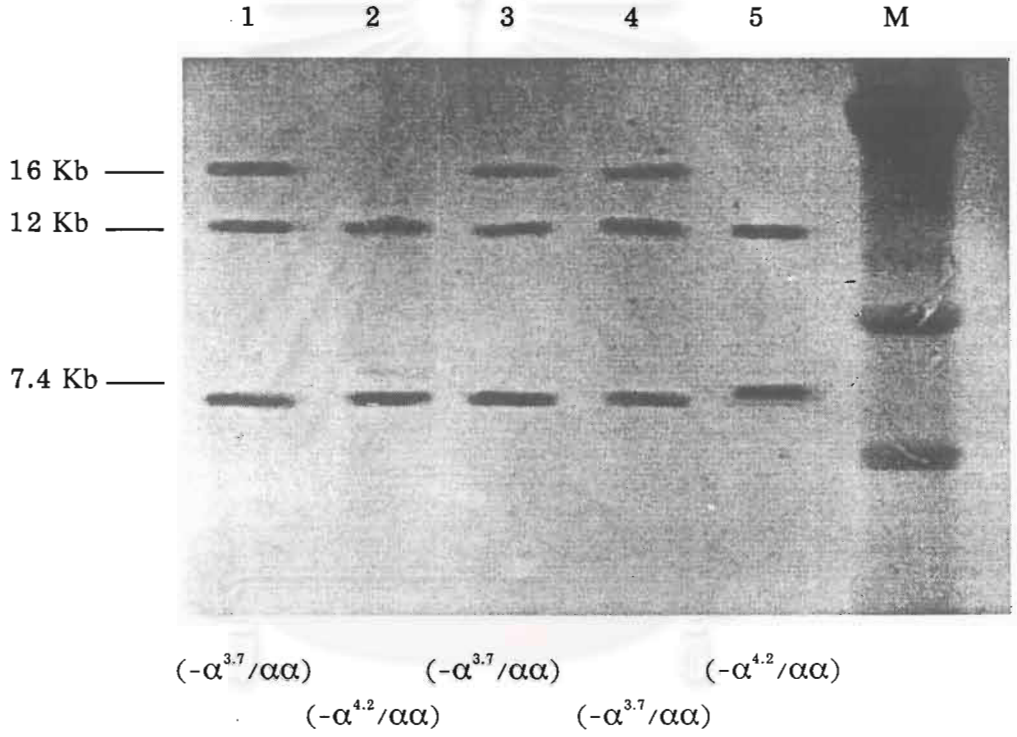
ชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ที่ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี อ่านผลได้ 61 รายที่นำมาศึกษา พบ จีโนไทป์ แบบ αα/αα จำนวน 46 ราย คิดเป็น 75.41% heterozygous $-\alpha^{3.7}$ จำนวน 10 รายคิดเป็น 16.39% heterozygous --SEA จำนวน 3 รายคิดเป็น 4.92% heterozygous ααα/αα จำนวน 1 รายคิดเป็น 1.64% และ compound heterozygous ($-\alpha^{3.7}$/--SEA) จำนวน 1 รายคิดเป็น 1.64% รวมแล้วคิดเป็นความถี่อัลลีล αα เท่ากับ 0.869 ความถี่อัลลีล $-\alpha^{3.7}$ เท่ากับ 0.090 ความถี่อัลลีล --SEA เท่ากับ 0.033 และความถี่อัลลีล ααα เท่ากับ 0.008 (ตารางที่ 10 และ 11)





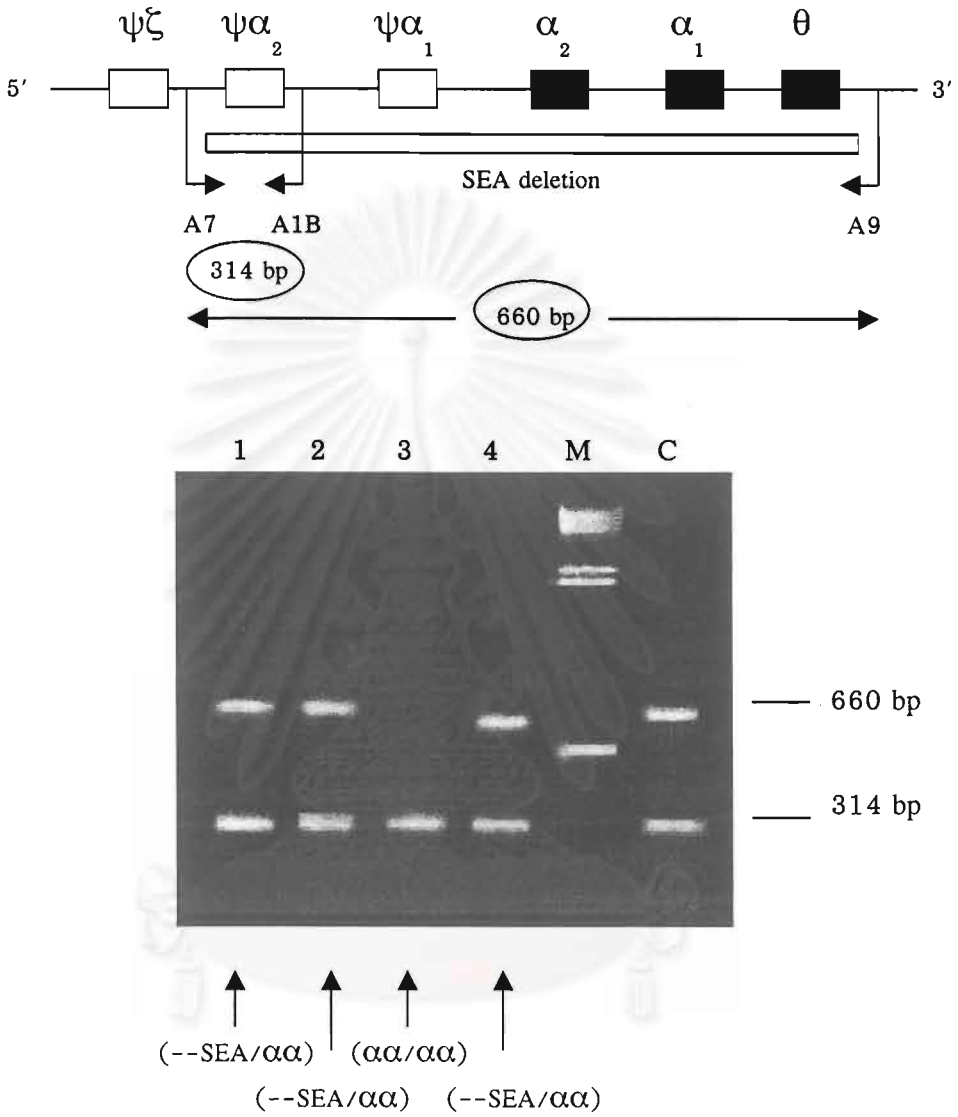
ภาพที่ 26 <u>บน</u> แสดงโครงสร้างของยีนแอลฟาโกลบินแบบปกติ (αα) แบบที่ยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไป 1 ยีน (-α) แบบที่มียีนแอลฟาโกลบินเกินมา 1 ยีน (ααα) และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI (▼)
<u>ล่าง</u> แสดงผลการศึกษายีนแอลฟาโกลบินด้วย Southern blot hybridization C เป็นดีเอนเอที่ทราบว่าเป็น heterozygote -α/αα M เป็น λ-HindIII size marker 1 และ 2 ตัวอย่าง heterozygote -α/αα 3 และ 5 เป็นตัวอย่างดีเอนเอคนปกติ (αα/αα) และ 4 เป็นตัวอย่าง heterozygote ααα/αα





ภาพที่ 27 บน แสดงโครงสร้างของยีนแอลฟาโกลบินแบบปกติ (αα) ยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไป 1 ยีนแบบ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bgl*II (▼)

ล่าง แสดงผลการศึกษายีนแอลฟาโกลบินด้วย Southern blot hybridization 1 3 และ 4 เป็นตัวอย่าง heterozygote $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 2 และ 5 เป็นตัวอย่าง heterozygote $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ และ M เป็น λ-HindIII size marker



ภาพที่ 28 บน แสดงโครงสร้างของยีนแอลฟาโกลบิน ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอนเอเพื่อตรวจสอบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด Southeast Asian (--SEA)

ล่าง แสดงผล 1.5% agarose gel electrophoresis การตรวจสอบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด SEA 1 2 และ 4 เป็นตัวอย่าง heterozygote --SEA/αα 3 เป็นตัวอย่างดีเอนเอปกติ (αα/αα) M เป็น λ-HindIII size marker และ C เป็นดีเอนเอที่ทราบว่าเป็น heterozygote --SEA/αα

ตารางที่ 10 ผลการศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีนแอลฟาโกลบิน ในประชากรชาวไทพวน ที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

จีโนไทป์	จำนวนโครโมโซม (%)						จำนวนโครโมโซมทั้งหมด (%)	
	อ. บ้านหมี่ จ.ลพบุรี		อ.เชียงคาน จ.เลย		อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี			
αα/αα	74	(85.06)	49	(74.24)	46	(75.41)	169	(79.97)
- $\alpha^{3.7}$/αα	5	(5.75)	2	(3.03)	10	(16.39)	17	(7.94)
- $\alpha^{4.2}$/αα	1	(1.15)	1	(1.52)	-		2	(0.93)
- -SEA/αα	7	(8.05)	13	(19.70)	3	(4.92)	23	(10.75)
- $\alpha^{3.7}$/- -SEA	-		-		1	(1.64)	1	(0.47)
ααα/αα	-		1	(1.52)	1	(1.64)	2	(0.93)
รวม	87	(100)	66	(100)	61	(100)	214	(100)

ตารางที่ 11 ผลการศึกษาความถี่อัลลีลของยีนแอลฟาโกลบินในประชากรชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี

	อ. บ้านหมี่ จ.ลพบุรี	อ.เชียงคาน จ.เลย	อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี	รวม
f (αα)	0.925	0.871	0.869	0.893
f (-$\alpha^{3.7}$)	0.029	0.015	0.090	0.042
f (-$\alpha^{4.2}$)	0.006	0.008	-	0.005
f (--SEA)	0.040	0.098	0.033	0.056
f (ααα)	-	0.008	0.008	0.005

บทที่ 6

อภิปรายผลการศึกษา

1. การศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน

การศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis ในชาวไทพวน 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่อาศัยอยู่ในบริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี, ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย และ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี พบอุบัติการณ์ฮีโมโกลบินอีเท่ากับ 16.85% 41.85% และ 11.50% ตามลำดับ คิดเป็นความถี่ยีนบีตาอีโกลบิน เท่ากับ 0.090 0.230 และ 0.065 ตามลำดับ

ยีนบีตาอีโกลบินเป็นยีนฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่งที่พบได้มากในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับในประเทศไทยมีรายงานความถี่ยีนในภาคกลางประมาณ 0.084 และพบความถี่สูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือแปรผันตั้งแต่ 0.150-0.500 (Flatz et al., 1956 ; Wasi et al., 1967 ; เสมอชัย พูลสุวรรณ, 2536 ; Fucharoen G. et al., 1997) หรือคิดเป็นอุบัติการณ์ประมาณ 30-40% (พรรณี ชิโนรักษ์ และ มุกดา คูหิรัญ, 2532-2535) ส่วนการศึกษาการกระจายความถี่ยีนบีตาอีโกลบินหรือฮีโมโกลบินอีในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ นั้นเดิมเคยเชื่อว่าจะพบความถี่สูงในประชากรที่มีเชื้อสายมอญ-เขมร แต่เมื่อได้มีการศึกษามากขึ้น เช่นในชาวเขมร พบความถี่ยีนบีตาอีโกลบิน เท่ากับ 0.327 ชาวมอญ 0.067 (Flatz et al., 1965) ชอง 0.589 ซาไก 0.025 (เยาวลักษณ์ วิไล, 2538) ไทพวน จ.ลพบุรี 0.129 (อุรศรี สูยะศุนานนท์, 2539) ชาวเขา 0.01 ผู้ไท 0.31 ลาวโซ่ง 0.05 (Fucharoen G. et al., 1997) กูย 0.367 (ประยุกต์ ศรีวิไล, 2541) จะเห็นได้ว่าความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินนั้นไม่ขึ้นกับเชื้อสายของประชากร โดยเฉพาะ ชาวผู้ไท ลาวโซ่ง และไทพวน ซึ่งในทางประวัติศาสตร์พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด จนเกือบจะเรียกได้ว่ามีเชื้อสายต้นกำเนิดเดียวกัน (ฤดีมน ปรีดีสนิท, 2539 ; วิเชียร วงศ์วิเศษ, 2525)

จากทฤษฎีการคัดเลือกตามธรรมชาติของฮีโมโกลบินอีที่มีต่อโรคมาลาเรีย ทำให้ไม่น่าแปลกใจที่ชาวไทพวนที่อาศัยอยู่ใน จ.เลย มีความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินสูงว่ากลุ่มอื่น ๆ เนื่องจากลักษณะทางภูมิศาสตร์ของพื้นที่เป็นภูเขา และป่า มีอากาศเย็นชื้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการระบาดของโรคมาลาเรียในอดีต เช่นเดียวกันกับประชากรกลุ่มอื่นที่อาศัยอยู่

ในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณริมฝั่งแม่น้ำโขง และจากการที่พบว่าในชาวไทพวนอีก 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่อาศัยอยู่ใน จ.ลพบุรี และจ.อุดรธานี ซึ่งอาศัยอยู่ในพื้นที่ราบโล่ง มีความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินไม่สูงมากนัก (0.090 และ 0.065 ตามลำดับ) ทำให้น่าจะเชื่อได้ว่าเดิมความถี่ยีนบีตาอีโกลบินในกลุ่มประชากร ไทพวนคงไม่สูงมากนัก แต่หลังจากมีการอพยพเปลี่ยนถิ่นฐานมาอยู่ในบริเวณที่มีโรคมาลาเรีย รวมทั้งอาจได้รับอิทธิพลจากกลุ่มประชากรเดิมที่อาศัยอยู่ก่อน ซึ่งมีความถี่ยีนบีตาอีโกลบินสูงกว่า เมื่อเวลาผ่านไปจึงทำให้ความถี่ยีนบีตาอีโกลบินที่พบในประชากรไทพวน จ.เลย สูงกว่าอีก 2 กลุ่มดังที่กล่าวมาแล้ว

2. การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คและดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน

2.1 การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบิน

การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบินในชาวไทพวน จ.ลพบุรี จำนวน 15 โครโมโซม พบยีนบีตาอีโกลบินที่สัมพันธ์อยู่กับ FW2 5 โครโมโซม คิดเป็น33.33% แต่มีบางรายที่มีลักษณะเป็น heterozygote EA และ เป็น heterozygote FW2/FW3 จึงทำให้ไม่สามารถจำแนกได้ว่ายีนบีตาอีโกลบินบนโครโมโซมดังกล่าวสัมพันธ์อยู่กับเฟรมเวิร์คใด แต่เนื่องจากในประชากรนี้พบลักษณะที่เป็น homozygote FW2 แต่ไม่พบลักษณะ homozygote FW3 เลย ทำให้คาดว่าแนวโน้มของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรกลุ่มนี้น่าจะสัมพันธ์อยู่กับ FW2 มากกว่า FW3 ซึ่งลักษณะ FW2 นี้พบว่าเป็นเฟรมเวิร์คที่สัมพันธ์กับยีนบีตาอีโกลบินของประชากรไทยส่วนใหญ่ (Fucharoen G. et al., 1990) นอกจากนี้ยังพบยีนบีตาอีโกลบินที่สัมพันธ์อยู่กับโครโมโซมชนิด FW1 ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ไม่มากนักในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่สามารถพบได้ในประชากรชาวยุโรป (Kazazian, 1985) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานไว้โดย Fucharoen G. et al. (1990) เยาวลักษณ์ วิไล (2538) และ สุรเชษฐ์ ผมคำ และ ภัทรพล คันศร (2541) ซึ่งพบเป็นส่วนน้อยในประชากรที่ศึกษา ซึ่งน่าจะเกิดจากการเกิด recombination ระหว่าง 5′-haplotype กับ 3′-haplotype FW1 ของยีนบีตาเอโกลบินในอดีต และเชื่อว่าน่าจะมีต้นกำเนิดที่ต่างจาก β^E-FW1 ที่พบในยุโรป

การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบินในชาวไทพวน จ.เลย จำนวน 34 โครโมโซมพบโครโมโซมบีตาอีโกลบินที่สัมพันธ์อยู่กับ FW2 มากถึง 22 โครโมโซม คิดเป็น 64.71% และสัมพันธ์อยู่กับ FW3 4 โครโมโซม คิดเป็น 11.76% และมีบางรายที่มี

ลักษณะเป็น heterozygote EA และ heterozygote FW2/FW3 ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ อย่างไรก็ตามการที่พบลักษณะ FW3 ในประชากรกลุ่มนี้เป็นข้อสนับสนุนต่อข้อสันนิษฐานที่ว่า การที่ความถี่ยีนบีตาอีโกลบินในประชากรไทพวนกลุ่มนี้สูงกว่าอีก 2 กลุ่มที่ทำการศึกษา อาจเนื่องมาจากประชากรมีความสัมพันธ์กับประชากรดั้งเดิมในพื้นที่หลังจากการอพยพย้ายถิ่นฐานทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร โดยลักษณะ FW3 ที่พบน่าจะเป็นลักษณะ FW3(Asian) ที่พบในประชากรเชื้อสายเขมร ที่เชื่อว่าเป็นประชากรดั้งเดิมของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สอดคล้องกับการศึกษาของ เสมอชัย พูลสุวรรณ (2537) ที่พบว่ากลุ่มชาติพันธุ์ไทย-ลาวมีความสัมพันธ์กับกลุ่มชาติพันธุ์เขมร

การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบินในชาวไทพวน จ.อุดรธานี จำนวน 9 โครโมโซมพบโครโมโซมบีตาอีโกลบินที่สัมพันธ์อยู่กับ FW2 7 โครโมโซม คิดเป็น 77.87% ที่เหลือนอกจากนั้นมีลักษณะเป็น heterozygote EA และ heterozygote FW2/FW3 ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ แต่คาดว่ายีนบีตาอีโกลบินในประชากรกลุ่มนี้น่าจะสัมพันธ์อยู่กับ FW2 ด้วยสาเหตุเดียวกับในกรณีชาวไทพวน จ.ลพบุรี

จากการศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบินในชาวไทพวนทั้ง 3 กลุ่มทำให้เชื่อว่าลักษณะพื้นฐานของยีนบีตาอีโกลบินของชาวไทพวนเดิม น่าจะเป็นลักษณะที่สัมพันธ์อยู่กับลักษณะ FW2 ส่วนลักษณะอื่นน่าจะเป็นลักษณะที่ปนเข้ามาในประชาเนื่องจากการแต่งงานหรือมีความสัมพันธ์กับประชากรเชื้อชาติอื่น

2.2 การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาเอโกลบิน

การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาเอโกลบินพบโครโมโซมชนิด FW3 และ FW2 เท่ากับ 47.87% และ 39.34% และพบโครโมโซมชนิด FW1 เพียง 16.49% เช่นเดียวกับการศึกษาในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ของ Antonarakis et al. (1985) ที่พบโครโมโซมชนิด FW3 และ FW2 เท่ากับ 47% และ 35% ตามลำดับ

2.3 การศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน

การศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินที่ตำแหน่งตัดจำเพาะ 7 ตำแหน่งในชาวไทพวน จ.ลพบุรี พบ 3 รูปแบบคือ (1) +----β^E+- (54.55%) (2) -+-++β^E+- (36.36%) และ (3) -+---+β^E++ (9.09%) โดย 2 รูปแบบแรกเป็นรูปแบบที่สามารถพบได้ทั่วไปในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Antonarakis et al., 1982b ;

Kazazian et al., 1984) และในประเทศไทย โดยเฉพาะในประชากรกลุ่มไทย-ลาว แต่โดยส่วนใหญ่ในกลุ่มประชากรต่างๆ มักพบรูปแบบที่ 2 (-+-++ β^E+-) ได้มากกว่ารูปแบบแรก (Hundrieser et al., 1988 ; Yongvanit et al., 1989 ; Fucharoen G. et al., 1990 ; Fucharoen G. et al., 1997) ส่วนแฮปโพลไทป์รูปแบบที่ 3 นั้นยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย อย่างไรก็ตามรูปแบบของช่วง 5′-haplotype ดังกล่าว (-+---+) มีรายงานว่าพบได้ในชาวอาฟริกัน ชาวโพลินีเซียน ชาวเมลานีเซียน (Wainscoat et al.,.1986) ชาวกรีซ ชาวอินเดีย (Long et al., 1990) สำหรับในประเทศไทยก็พบได้ในการศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินในรายงานของ Antonarakis et al. (1982b) Hundrieser et al. (1988) Yongvanit et al. (1989) และ สุรเชษฐ์ ผมคำ และ ภัทรพล คันศร (2541) ลักษณะที่พบจะสัมพันธ์อยู่กับ FW2 และ FW3 ดังนั้นในทางทฤษฎีสามารถเกิด recombination ระหว่างช่วง 5′-haplotype ที่มีรูปแบบเป็น -+---+ กับ 3′-haplotype ของยีนบีตาอีโกลบิน FW1 ได้ เนื่องจากมีช่วงที่เป็น recombination hot spot อยู่ระหว่างช่วงทั้งสอง โดย Antonarakis et al. (1982a) เสนอว่าน่าจะมีความถี่ของการเกิด recombination อยู่ประมาณ 0.03 centimorgan ทำให้สามารถเกิดรูปแบบของความสัมพันธ์ระหว่างดีเอนเอทั้งสองช่วงได้มากกว่า 1 รูปแบบ

การศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในชาวไทพวน จ.เลย พบ 4 รูปแบบคือ (1) -+-++ β^E+- (38.46%) (2) +---- β^E+- (30.77%), (3) +---- β^E-+ (23.08%) และ (4) -++-+ β^E+- (7.69%) 2 รูปแบบแรกที่พบเป็นลักษณะพื้นฐานของยีนบีตาอีโกลบินที่พบได้ทั่วไปดังที่ได้กล่าวมาแล้วก่อนหน้านี้ รูปแบบที่ 3 เป็นลักษณะที่พบได้ในประชากรที่มีเชื้อชาติเขมร (Hundrieser et al., 1988) เช่นในชาวชอง (Fucharoen G. et al., 1997) โส้ (Yongvanit et al., 1989) และชาวกูย (ประยุกต์ ศรีวิไล, 2541) ส่วนรูปแบบที่ 4 เป็นอีกรูปแบบหนึ่งของยีนบีตาอีโกลบินที่พบได้บ้างแม้จะไม่มากนักดังเช่นที่พบในภาคเหนือของประเทศไทย และในประเทศกัมพูชา (Hundrieser et al., 1988) การพบลักษณะแฮปโพลไทป์ที่หลากหลายต่างไปจากชาวไทพวนอีก 2 กลุ่มที่ทำการศึกษาน่าจะเป็นข้อสนันสนุนอีกข้อหนึ่งของอิทธิพลของประชากรดั้งเดิมในพื้นที่ที่มีต่อชาวไทพวนกลุ่มนี้ภายหลังการอพยพ

การศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในชาวไทพวน จ.อุดรธานีพบเพียง 2 รูปแบบคือ (1) -+-++ β^E+- (66.67%) และ (2) +---- β^E+- (33.33%) ซึ่ง

ไม่แตกต่างจากประชากรจากส่วนต่างๆ ในประเทศไทย โดยเฉพาะชาวผู้ไทย ซึ่งเชื่อว่าเป็นประชากรที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับชาวไทพวนที่ทำการศึกษา (Fucharoen G. et al., 1997) จากการพบลักษณะแฮปโพลไทป์เพียง 2 รูปแบบในประชากรนี้ ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบได้ทั่วไปในประชากรไทย-ลาว ทำให้เชื่อว่าประชากรกลุ่มนี้น่าจะมีความสัมพันธ์กับประชากรเชื้อชาติอื่นค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะกับประชากรที่มีเชื้อสายเขมรที่พบได้มากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน 2 รูปแบบนี้น่าจะเป็นรูปแบบดั้งเดิมที่เป็นต้นกำเนิดของกลุ่มชาติพันธุ์ไทย-ลาว ที่มีอิทธิพลต่อประชากรไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีความถี่ยีนบีตาอีโกลบินสูงที่ตรวจพบในปัจจุบัน

2.4 การศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบิน

การศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินในชาวไทพวนทั้ง 3 กลุ่มพบว่า 5′-haplotype แบบ +---- เป็นรูปแบบที่พบได้มากที่สุดถึง 85.55% สัมพันธ์อยู่กับเฟรมเวิร์คทั้ง 3 แบบ ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปในเกือบทุกประชากร (Wainscoat et al., 1986 ; Long et al., 1990) นอกจากนี้ในประชากรทั้ง 3 กลุ่ม ยังพบ 5′-haplotype แบบ -+-++ และ -+++- ซึ่งเป็นความหลากหลายของแฮปโพลไทป์ที่สามารถพบได้ในประชากรต่างๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และ 5′-haplotype แบบ -+---+ ++-++ และ ----+ ซึ่งพบได้ไม่บ่อยนัก โดยแบบ -+---+ เป็นรูปแบบที่พบได้บ้างในประชากรไทย และประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้บางกลุ่ม เช่นชาวกัมพูชา และอินเดีย (Yongvanit et al., 1989 ; Flint et al., 1993) แบบ ++-++ เป็นรูปแบบที่พบได้ในชาวอินเดีย และกรีซ (Wainscoat et al., 1986 ; Long et al., 1990 ; Varawalla et al., 1992 ; Flint et al., 1993) และแบบ ----+ เป็นรูปแบบที่พบในยุโรป และอาฟริกา (Wainscoat et al., 1986 ; Long et al., 1990 ; Flint et al., 1993) จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่าประชากรชาวไทพวน จ.อุดรธานี เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายของรูปแบบมากที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการแต่งงาน หรือการมีความสัมพันธ์กับประชากรเชื้อชาติอื่นที่ไม่มียีนบีตาอีโกลบินในประชากรหรือมีความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินต่ำ

3. การศึกษารูปแบบของยีนแอลฟาโกลบิน

การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$), rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และ Southeast Asian deletion (--SEA) ในชาวไทพวน จ.ลพบุรี พบความถี่อัลลีลของทั้ง 3 อัลลีลเท่ากับ 0.029 0.006 และ 0.040 ตาม

ลำดับ ในชาวไทพวน จ.เลย พบการขาดหายไปทั้ง 3 รูปแบบในความถี่เท่ากับ 0.015 0.008 และ 0.098 ตามลำดับ และพบ triplicated α-globin gene ในความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.008 ในชาวไทพวน จ.อุดรธานี พบรูปแบบการขาดหายไปเพียง 2 รูปแบบคือ rightward deletion และ Southeast Asian deletion ในความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.090 และ 0.033 ตามลำดับ และพบ triplicated α-globin gene ในความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.008 จะเห็นได้ว่าอัลลีลทั้ง 4 รูปแบบของยีนแอลฟาโกลบินมีความถี่แตกต่างกันในแต่ละประชากร โดยในประชากรชาวไทพวน จ.เลย พบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ Southeast Asian deletion ในความถี่อัลลีลที่สูงกว่าที่พบในประชากรอีก 2 กลุ่ม ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการเกิด recombination แบบไร้กฎเกณฑ์ และทฤษฎีการคัดเลือกตามธรรมชาติที่มีต่อโรคมาลาเรีย เช่นเดียวกับในกรณีของฮีโมโกลบินอี คือผู้ที่มีอัลลีล --SEA จะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในบริเวณที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย นอกจากนี้การที่อัลลีล --SEA เป็น recessive lethal allele ทำให้ผู้ที่มีจีโนไทป์ของยีนแอลฟาโกลบินเป็น homozygote --SEA จะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นอัลลีล --SEA ที่พบในประชากรทั่วไปจะอยู่ในสภาพ heterozygote ซึ่งอัลลีลที่แฝงอยู่ในประชากรนี้จะเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการแพร่กระจายของอัลลีลนี้ออกไปในประชากรได้โดยง่าย นอกจากนี้การพบความถี่อัลลีล --SEA ในประชากรชาวไทพวน จ.เลย สูงกว่าที่พบในประชากรอีก 2 กลุ่มที่ทำการศึกษา สอดคล้องกับการศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของโรคมาลาเรียที่มีผลกระทบต่อประชากรไทพวนที่อาศัยอยู่ใน จ.เลย

สำหรับการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินอีก 2 แบบ และ triplicated α-globin gene ในประชากรไทพวนพบว่า rightward deletion เป็นรูปแบบที่พบได้มากกว่า leftward deletion และ triplicated α-globin gene เนื่องจากลักษณะทั้ง 3 เป็นลักษณะที่เกิดขึ้นได้ในขั้นตอนการเกิด recombination ขณะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยการเกิด unequal crossing over และจากบทความของ Flint และคณะ (1993) ที่แสดงให้เห็นว่าการกระจายความถี่ของ $-\alpha^{3.7}$ และ $-\alpha^{4.2}$ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการระบาดของโรคมาลาเรียเสมอไป ดังนั้นจึงไม่เป็นที่น่าแปลกใจว่าจะพบความถี่ที่แตกต่างกันในแต่ละประชากร ส่วนในประชากรไทพวน จ.อุดรธานีที่พบความถี่ของ $-\alpha^{3.7}$ สูงกว่าในประชากรกลุ่มอื่น ๆ นั้น นอกจากสาเหตุที่กล่าวมาแล้ว อาจเนื่องจากในประชากรเริ่มต้นที่อพยพย้ายถิ่นฐานมามีความถี่ของอัลลีล $-\alpha^{3.7}$ สูงกว่าอัลลีลอื่น

อนึ่งในชาวไทพวน อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี พบผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น $-\alpha^{3.7}$/--SEA 1 คน เนื่องมาจากในไทพวนกลุ่มนี้พบผู้ที่มีจีโนไทป์ $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ และ --SEA/$\alpha\alpha$ อยู่ด้วย จึงเป็นไปได้ที่จะถ่ายทอดลักษณะ $-\alpha^{3.7}$ และ --SEA มาให้กับไทพวนผู้นี้ ซึ่งในขณะเดียวกันไม่พบผู้ที่มีจีโนไทป์แบบ $-\alpha^{4.2}$ ในไทพวนกลุ่มนี้เลย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาความถี่ยีนบีตาอีโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis (TBE buffer ; pH 8.6) ในชาวไทพวน 3 กลุ่มคือกลุ่มที่อาศัยอยู่บริเวณ ต.หนองทรายขาว อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี จำนวน 89 ราย พบความถี่ยีนบีตาอีโกลบินเท่ากับ 0.090 บริเวณ ต.บ้านกลาง อ.เชียงคาน จ.เลย จำนวน 74 ราย พบความถี่ยีนบีตาอีโกลบินเท่ากับ 0.230 และบริเวณ ต.บ้านค้อ อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี จำนวน 69ราย พบความถี่ยีนบีตาอีโกลบินเท่ากับ 0.065

2. การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คและดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน

2.1 การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบินในชาวไทพวนทั้ง 3 กลุ่ม พบว่ายีนบีตาอีโกลบินของประชากรทั้ง 3 กลุ่มมีแนวโน้มสัมพันธ์กับโครโมโซมชนิด FW2 เป็นหลัก และพบโครโมโซมชนิด FW3 จำนวนหนึ่งในประชากร จ.เลย ซึ่งเชื่อว่าน่าจะเป็นเหตุการณ์ที่เกิดจากอิทธิพลของชนชาติดั้งเดิมในพื้นที่ที่มีลักษณะของยีนบีตาอีโกลบินสัมพันธ์อยู่กับโครโมโซม FW3(Asian) ที่มีความสัมพันธ์หรือแต่งงานระหว่างชนชาติ โดยเฉพาะชนชาติไทย-เขมร ที่ปนเข้ามาในกลุ่มประชากรหลังจากการอพยพ

2.2 การศึกษาดีเอนเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาเอโกลบินในชาวไทพวนทั้ง 3 กลุ่ม พบพบว่ายีนบีตาเอโกลบินของประชากรทั้ง 3 กลุ่มสัมพันธ์กับโครโมโซมชนิด FW3 และ FW2 เท่ากับ 47.87% และ 39.34% ตามลำดับ

2.3 การศึกษาดีเอนเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในชาวไทพวนทั้ง 3 กลุ่มพบว่า ยีนบีตาอีโกลบินของชาวไทพวนทั้ง 3 กลุ่มพบลักษณะแฮปโพลไทป์ 5 รูปแบบ คือ (1)-+-++β^{E}+- (43.33%) (2)+----β^{E}+- (40.00%) (3)+----β^{E}-+ (10.00%) (4)-+++-+β^{E}+- (3.33%) และ (5)-+---+β^{E}++ (3.33%) โดยพบว่า 2 รูปแบบแรกเป็นรูปแบบที่พบได้มากที่สุด เช่นเดียวกับที่พบในประชากรเชื้อสายไทย-ลาวอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ รูปแบบที่ (3) เป็นรูปแบบที่พบได้ในชาวกัมพูและประชากรเชื้อสายเขมร เช่นชาวชอง โส้ และกูย ส่วนรูปแบบที่ (4) และ (5) เป็นรูปแบบที่พบได้บ้างในประเทศไทยและชาวกัมพูชา ซึ่งอาจเกิดจาก recombination ระหว่างช่วง 5′-haplotype และ

3′-haplotype จึงน่าจะเชื่อได้ว่าชาวไทพวนเป็นประชากรที่มีเชื้อชาติและต้นกำเนิดใกล้ชิดกับชาวไทย-ลาวอื่นๆ เช่น คนไทย ชาวผู้ไทย และลาวโซ่ง และมีการแต่งงานข้ามเชื้อชาติระหว่างชาวไทพวนกับชนชาติอื่น ดังเช่นที่พบในประชากร จ.ลพบุรี และ จ.เลย สำหรับการ

2.4 ศึกษาดีเอนแอฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินพบ 5′-haplotype แบบ +---- ได้มากที่สุด และสัมพันธ์กับเฟรมเวิร์คทั้ง 3 รูปแบบ นอกจากนั้นเป็น 5′-haplotype แบบ -+-++ -+++- ++-++ -+--+ และ ----+

3. การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินของประชากรไทพวนใน จ.ลพบุรี พบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) และ Southeast Asian deletion (--SEA) ในความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.029 0.006 และ 0.040 ตามลำดับ ในชาวไทยพวน จ.เลยพบ ชนิด rightward deletion leftward deletion Southeast Asian deletion และ triplicated α-globin gene ในความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.015 0.008 0.098 และ 0.008 ตามลำดับ ในชาวไทพวน จ.อุดรธานีพบ rightward deletion Southeast Asian deletion และ triplicated α-globin gene ในความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.090 0.033 และ 0.008 ตามลำดับ โดยความถี่ของ Southeast Asian deletion ที่สูงขึ้นในประชากรไทพวน จ.เลย สอดคล้องกับความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินที่สูงกว่าประชากรกลุ่มอื่น ซึ่งน่าจะได้รับอิทธิพลจากการระบาดของโรคมาลาเรียในพื้นที่เป็นปัจจัยหลัก

4. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรนั้น ข้อมูลทางประวัติศาสตร์ของประชากรเป็นข้อมูลสำคัญที่ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากร และนอกจากนี้การศึกษาพงศาวลีจะทำให้สามารถจำแนกลักษณะจีโนไทป์รูปแบบต่างๆ ได้ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถทำได้เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างเลือดชาวไทพวนบางส่วนไม่กล้าที่เจาะเลือด และผู้ชายในครอบครัวออกไปทำงานที่อื่น ทำให้ไม่สามารถรวบรวมสมาชิกในครอบครัวได้ครบ

5. ปัจจุบันได้มีการศึกษา mitochondrial DNA เพื่อบ่งถึงต้นกำเนิด และความสัมพันธ์ของแต่ละประชากร ซึ่งน่าจะนำมาใช้ในการศึกษาต้นกำเนิดของประชากรไทพวนกลุ่มต่างๆ และรวมไปถึงประชากรเชื้อสายอื่นๆ ในประเทศไทยต่อไป

6. ข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลทางสาธารณสุข เพื่อวางแผนในการพัฒนาคุณภาพชีวิตประชากรในอนาคต โดยเฉพาะในชาวไทพวน จ.เลย ซึ่งมีความถี่ของฮีโมโกลบินอี และการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิด --SEA สูงกว่ากลุ่มอื่น ทำให้มีความเสี่ยงต่อโรคธาลัสซีเมียสูงกว่าประชากรอีก 2 กลุ่มที่ทำการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กุลนภา ฟู่เจริญ. 2533. ฮีโมโกลบินอพะธิส์. ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

ถวัลยวงค์ รัตนศิริ, สุพรรณ ฟู่เจริญ, กุลนภา ฟู่เจริญ , อมรรัตน์ รัตนศิริ และ พวงรัตน์ เชาวะเจริญ. 2539. การศึกษาอุบัติการของอัลฟาธาลัสซีเมียจากเลือดสายสะดือทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์. (บทคัดย่อ) การประชุมสัมมนาทางวิชาการเรื่องการควบคุมและการป้องกันโรคธาลัสซีเมีย. ครั้งที่ 4. 21-22 พฤศจิกายน จ.ขอนแก่น.

ประยุกต์ ศรีวิไล. 2541. การศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินและรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในประชากรชาวชาวกูยจังหวัดมหาสารคามและสุรินทร์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี (วินิจจะกูล) ฟู่เจริญ และ สุทัศน์ ฟู่เจริญ. 2541. Molecular biology of thalassemias and abnormal hemoglobins. ธาลัสซีเมียการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR. โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล.

พรรณี ชิโนรักษ์ และ มุกดา คูหิรัญ. 2532-2535. การศึกษาและการจัดการภาวะโลหิตจางเพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตของประชากรไทยในภาคอีสาน. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (โครงการต่อเนื่อง)

โพธิ์ แซมลำเจียก. 2537. ตำนานไทยพวน. กทม. : บริษัท ก.พลพิมพ์ พริ้นติ้ง จำกัด.

เยาวลักษณ์ วิไล. 2538. ลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอี-โกลบินในชนเผ่าชาไกและชาวชอง. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฤดีมน ปรีดีสนิท. 2539. วิถีชีวิต สังคม วัฒนธรรมประเพณี และประวัติศาสตร์ชุมชนกรณีไทย-พวน อำเภอบ้านผือ. ศูนย์ศิลปวัฒนธรรม สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

วิเชียร วงศ์วิเศษ. 2525. ไทยพวน. อนุสรณ์งานฌาปนกิจศพ นางละมัย วงศ์วิเศษ. กทม : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

วีระพงศ์ มีสถาน. 2539. สารานุกรมกลุ่มชาติพันธุ์ : พวน. กทม : สำนักงานวิจัยภาษาและวัฒนธรรม เอเชียอาคเนย์ สถาบันวิจัยภาษาและวัฒนธรรมเพื่อพัฒนาชนบท มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุรเชษฐ์ ผมคำ และ ภัทรพล คันศร. 2541. บีตาโกลบินยีนแฮปโพลไทป์ในผู้ที่เป็นฮีโมโกลบินอีโฮโมไซโกต. ภาคนิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เสมอชัย พูลสุวรรณ. 2536. วิวัฒนาการของ beta-globin polymorphisms ในประเทศไทย. สัมมนาพันธุศาสตร์ครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยมหิดล.

เสมอชัย พูลสุวรรณ. 2537. บรรพบุรุษของคนไทยมาจากไหน:การวิเคราะห์และตีความจากหลักฐานใหม่ทางพันธุศาสตร์. วารสารธรรมศาสตร์ ปีที่ 20 ฉบับที่ 2: 74-103.

อุไรวรรณ ยิ้มประเสริฐ และ แขขัย ไพกะเพศ. 2540. พาหะอัลฟาศูนย์และบีตา-ธาลัสซีเมียในกลุ่มประชากรทั่วไปที่ให้ผลบวกต่อการตรวจกรองธาลัสซีเมีย. ภาคนิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อุรศรี สูยะศุนานนท์. 2539. การศึกษาชนิดของฮีโมโกลบินในชนกลุ่มน้อยไทพวน วิทยาปฏิบัติปริญญาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Antonarakis, S.E., Boehm, C.D., Giardina, P.J.V. and Kazazian, H.H. 1982(a). Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the β-globin gene cluster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 137-141.

Antonarakis, S.E., et al. 1982(b). Evidence for multiple origins of the β^E-globin gene in Southeast Asia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 6608-6611.

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

Chakravarti, A., et al. 1984. Nonuniform recombination within the human β-globin gene cluster. Am. J. Hum. Genet. 36 : 1239-1258.

Cheng, T., Orkin, S.H., Antonarakis, S.E., Potter, M.J. Sexton, J.P. et al. 1984. β-thalassemia in Chinese : Use of *in vivo* RNA analysis and oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 2821-2825.

Flatz, G., Pik, C. and Sringgam, S. 1965. Haemoglobin E and β-thalassemia : their distribution in Thailand. Ann. Hum. Genet. 29 : 151-170.

Flint, J., Harding, R.M., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. 1993. The molecular genetics of the haemoglobinopathies. Baillere's clinical haematology 6(1) : 215-262.

Fucharoen, G., Fucharoen, Sp., Jetsrisuparb, A. and Fukumaki, Y. 1990. Molecular basis of HbE-β-thalassemia and the origin of HbE in Northeast Thailand : identification of one novel mutation using ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้ from buffy coat. Biochemical and biophysical reserch coมิลลิโมลาร์unications 170(2) : 698-704.

Fucharoen, G. and Fucharoen, Sp. 1994. Rapid and simultaneous non-radioactive method for detecting α-thalassemia 1 (SEA type) and Hb Constant Spring genes. Eur. J. Haematol. 53 : 186-187.

Fucharoen, G., et al. 1997. Beta-globin gene haplotypes in some minor ethnic groups in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 28 supp.3 : 115-119.

Fucharoen, S. 1997. Thalassemia. Abonormalities of Protein Structure in Relation to Human Disease pp. (2-1)-(2-19). September 1-5 Bangkok: Chulabhorn Research Institute.

Fucharoen, Sp., et al. 1990. Molecular characterization and nonradioactive of beta-thalassemia in Malaysia. Acta. Haemato. 84 : 82-88.

Fucharoen, Sp., et al. 1994. A simple non-radioactive assay for hemoglobin E gene in prenatal diagnosis. Clinica Chimica Acta 229:197-203.

Galanello, R., et al. 1983. A family with segregating triplicated alphaglobin loci and beta thalassemia. Blood 62(5) : 1035-1040.

Harteveld, K.L., Losekoot, M., Fodde, R., Giodano, P.C. and Bernini, L.F. 1997. The involvement of Alu repeats in recombination events at the α-globin gene cluster : characterization of two α^0-thalassemia deletion breakpoints. Hum Genet. 99 : 528-534.

Higgs, D.R., et al. 1989. A review of the molecular genetics of the human α-globin gene cluster. Blood 73(5) : 1081-1104.

Hundrieser, J., Sanguansermsri, T., Papp, T., Laig, M. and Flatz, G. 1988. β-globin gene linked DNA haplotypes and frameworks in three South-East Asian populations. Hum. Genet. 80 : 90-94.

Kan, Y.W., Lee, K.Y., Furbetta, M., Angius, A. and Cao, A. 1980. Polymorphism of DNA sequence in the β-globin gene region application to prenatal diagnosis of β^0 thalassemia in Sardinia. N. Engl. J. Med. 302 (4) 185-188.

Kazazian, H.H.Jr., et al. 1984. Hemoglobin E in Europeans : further evidence for multiple origins of the β^E-globin gene. Am. J. Hum. Genet. 36 : 212-217.

Kanavakis, E., Metaxotoe-Mavromati, A., Kattamis, C., Wainscoat, S. and Wood, W.G. 1983. The triplicated α gene loci and β thalassemia. Br. J. Haematol. 54 : 201-207.

Long, F.C., Chakravarti, A., Boehm, C.D., Antonarakis, S.E. and Kazazian, H.H. 1990. Phylogeny of human β-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. Am. J. Phys. Anthropology 81 : 113-130.

Nakatsuji, T., Kutlar, A., Kutlar, F. and Huisman, T.H.J. 1986. Haplotype among Vietnamese hemoglobin E homozygotes including one with a γ-globin gene triplication. Am. J. Hum. Genet. 38 : 981-983.

Orkin, S.H., et al. 1982. Linkage of β-thalassemia mutation and β-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β-globin gene cluster. Nature 296 : 627-631.

Pravatmuang, P., Tiloklurs, M., Suannum, M. and Chaipat, C. 1995. Phitsanulok population : the highest incidence of hemoglobin E in the Northern provinces of Thailand and PND counseling. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 26 suppl. 1 : 266-270.

Sanchaisuriya, K., et al. 1997. Molecular and hematological characterization of HbE heterozygote with α-thalassemia determinant. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 28 suppl.3 : 100-113.

Sriroongrueng, W., Pornpakul, M., Panich, V. and Fucharoen, S. 1997. α-thalassemia incidence in southern Thailand by restriction endonuclease analysis of globin DNA from placental blood at Songklanagarind hospital. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 28 suppl.3 : 93-96.

Trent, R.J., Higgs, D.R., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. 1981. A new triplicated α-globin gene arrangement in man. Br. J. Haematol 49 : 149-152.

Varawalla, N.Y., Fitches, A.C. and Old, J.M. 1992. Analysis of β-globin gene haplotype in Asian Indians : origin and spread of β-thalassemia on the Indian subcontinent. Hum Genet 90 : 443-449.

Wainscoat, J.S., et al. 1986. Evolutionary relationships of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphism. Nature 319 : 491-493.

Wasi, P., Na-Nakorn, S. and Suingdumrong, A. 1967. Studies of the distribution of haemoglobin E, thalassemias and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in north-eastern Thailand. Nature 214 : 501-502.

Winichagoon, P., Fucharoen, S., Wilairat, P. and Fukumaki, Y. 1995. Molecular mechanisms of thalassemia in Southeast Asia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 26 suppl. 1 : 235-140.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียมน้ำยา

น้ำยาสำหรับ haemoglobin electrophoresis

1. Tris-EDTA-Borate buffer pH 8.6

tris base	10.3	กรัม
EDTA (disodium salt)	0.6	กรัม
boric acid	3.4	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ	500	มล.
ปรับ pH 8.6		
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.

2. Ponceau S staining (0.5% น้ำหนัก/ปริมาตร)

ponceau S	0.5	กรัม
trichloroacetic acid	5	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	100	มล.

3. Destaining solution (5% acetic acid)

glacial acetic acid	5	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	100	มล.

น้ำยาสำหรับการสกัดดีเอนเอ

1. 0.9% NaCl

NaCl	9	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.

2. 3% dextran

dextran	30	กรัม
0.9% NaCl	1000	มล.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. lysis buffer ; pH 7.4

ammonium chloride	6.63	กรัม
potassium carbonate	0.08	กรัม
EDTA (disodium salt) 500 มิลลิโมลาร์	16	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.
autoclave ก่อนใช้		

4. SE buffer ; pH 7.8

Na_2EDTA	9.30	กรัม
NaCl	4.83	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1000	มล.

น้ำยาสำหรับ gel electrophoresis

1. 10X electrophoresis buffer (E buffer) ; pH 7.5

1 โมลาร์ Tris-HCl	600	ไมโครลิตร
5 โมลาร์ NaCl	2000	ไมโครลิตร
1 โมลาร์ $MgCl_2$	600	ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.

เมื่อจะใช้งานเจือจางให้เป็น 1X ด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 : 10

2. TE buffer (10 มิลลิโมลาร์ Tris acetate - 1 มิลลิโมลาร์ EDTA)

1 โมลาร์ Tris acetate	5	มล.
500 มิลลิโมลาร์ EDTA	1	มล.

3. loading dye (6X)

0.25% bromophenol blue

0.25% xylene cyanol

30% glycerol

5. ethidium bromide 0.5 มก. / มล.

น้ำยาสำหรับ Southern blot electrophoresis

1. Partial Depurination Buffer (0.25 โมลาร์ HCl)

conc. HCl	11	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	500	มล.

2. Denaturing Solution (0.5 โมลาร์ NaOH - 1.5 โมลาร์ NaCl)

NaOH	20	กรัม
NaCl	87.66	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.

3. Neutralization Solution (0.5 โมลาร์ Tris-HCl - 3 โมลาร์ NaCl ; pH 7.5)

tris base	60.55	กรัม
NaCl	175.32	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ	500	มล.
ปรับ pH 7.5		
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.
autoclave ก่อนใช้		

4. 20X SSC (3 โมลาร์ NaCl - 0.3 โมลาร์ trisodium Citrate ; pH 7.0)

NaCl	175.32	กรัม
trisodium citrate	88.2	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ	500	มล.
ปรับ pH 7.5		
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.

น้ำยาสำหรับ hybridization และ color developing

1. Prehybridization Buffer

20X SSC	10	มล.
10% N-laury sarcosine	0.4	มล.
20% SDS	0.04	มล.
blocking powder	0.4	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	40	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Washing buffer 1 (2X SSC - 0.1% SDS)

20X SSC	100	มล.
20% SDS	5	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.

3. Washing buffer (0.5X SSC - 0.1% SDS)

20X SSC	25	มล.
20% SDS	5	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.

4. Dig Buffer 1 (100 มิลลิโมลาร์ Tris - 150 มิลลิโมลาร์ NaCl ; pH 7.5)

1 โมลาร์ tris pH7.5	100	มล.
5 โมลาร์ NaCl	27	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.
autoclave ก่อนใช้		-

5. Dig Buffer 2

0.5% blocking powder in buffer 1

6. Dig Buffer 3 (100 มิลลิโมลาร์ Tris - 100 มิลลิโมลาร์ NaCl - 50 มิลลิโมลาร์ MgCl ; pH 9.5)

tris-HCl	12.11	กรัม
NaCl	5.86	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ	500	มล.
ปรับ pH 9.5		
1โมลาร์ $MgCl_2$	50	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม	1000	มล.

7. Dig Buffer 4 (10 มิลลิโมลาร์ Tris - 1 มิลลิโมลาร์ EDTA ; pH 8.0)

1 โมลาร์ tris pH 8.0	10	มล.
500 มิลลิโมลาร์ EDTA	2	มล.
autoclave ก่อนใช้		

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอุรศรี สูยะศุนานนท์ เกิดวันที่ 26 กันยายน พ.ศ.2517 ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ จากภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในภาคต้นปีการศึกษา 2542

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย