บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสาร

ประวัติของชาวกูย

ชาวกูย (Kui) มีคำเรียกต่างกันออกไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น "กูย" "โกย" "กวย" "กุย และ "ส่วย" มีความหมายแปลว่า "คน" คนไทยเรียกชนกลุ่มนี้ว่า "ส่วย" (Soai) ชาวตะวันตกเรียกชนกลุ่มนี้ว่า "กูย" หรือ "ส่วย" (Scidenfaden, 1952) ในที่นี้จะใช้คำว่า "กูย" เพราะเป็นคำกลางๆ และนิยมใช้กันทั่วๆ ไปไม่ใช้คำว่า "ส่วย" ตามที่คนไทยรู้จักเนื่องจากความหมายคำว่าส่วย ซึ่งหมายถึงการเก็บของป่าส่งราชสำนักแทนการไปรบ หรืออีกความหมาย คือ พวกที่มีวัฒนธรรมต่ำกว่าเพื่อนบ้าน คือ เขมรและลาวซึ่งไม่เหมาะสม ชาวกูยเป็นกลุ่มชาติพันธุ์ออสโตรเอเชียติก (Austro-Asiatic) หรือมอญ-เขมร (Mon-khmer) โดยทั่วไปมีผิวดำ สูงปานกลาง เฉลี่ยประมาณ 160 ซ.ม. จมูกแบน ไหล่กว้าง (ไพฑูรย์ มีสกุล, 2531) มีเลือดผสมระหว่างพวกเวดดิด (Vaddid) กับพวกเมลานีเซี่ยน (Melanesian) มีรูปร่างหน้าตาใกล้เคียงพวก เซมัง หรือพวกเงาะ (จิตร ภูมิศักดิ์, 2519)

กลุ่มชาติพันธุ์ (ethnic group) คือ กลุ่มคนที่มีจุดกำเนิดของบรรพชนร่วมกันมีขนบธรรมเนียมประเพณีและภาษาตลอดจนมีความรู้สึกในความเป็นเผ่าเดียวกัน (บุญยงค์ เกศเทศ,2536) Chartes (1982) ได้เสนอแนวคิดเกี่ยวกับการจำแนกกลุ่มชาติพันธุ์ไว้ 2 รูปแบบ คือ แบบชาติพันธุ์ที่ตั้งถิ่นฐานใกล้เคียงกันพึ่งพาอาศัยกัน และแบบที่ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์อยู่ในลักษณะชนกลุ่มใหญ่และชนกลุ่มน้อย

สุเรขา สุพรรณไพบูลย์ (2530) ได้ทำการวิจัยและค้นคว้าซึ่งพบว่า พวกชาวกูยหรือส่วย ซึ่งเป็นชนกลุ่มมอญ-เขมรมีลักษณะคล้ายกับชาวชอง ที่เขาได้ทำการศึกษา

Scidenfaden (1952) กล่าวถึงชาวกูยว่า เริ่มมีการอพยพครั้งแรกจากตอนเหนือของอินเดียเคลื่อนตัวมาทางตะวันออกเข้าสู่เขตประเทศพม่า และไทยเมื่อราว 1200 ปีก่อนคริสตกาล หรือประมาณ 3000 ปีเศษๆ ชาวกูยตั้งถิ่นฐานอยู่แขวง อัตตาปือ แสนแป จำปาศักดิ์ และสาระวันในตอนใต้ของประเทศลาว บางส่วนของภาคกลางประเทศกัมพูชา และภาคเหนือของไทย (สมทรง บุรุษพัฒน์, 2538) เป็นกลุ่มชนที่ชอบอิสระไม่ชอบให้เผ่าอื่นปกครอง การรบส่วนใหญ่ใช้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

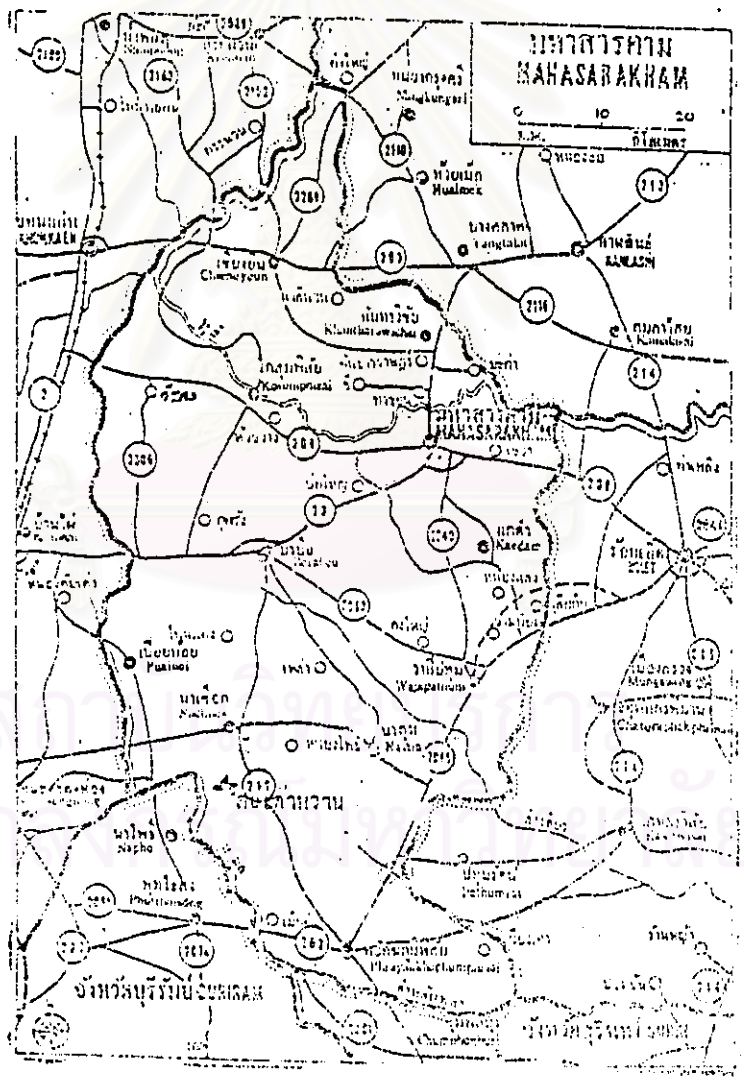
ช้าง และมีความชำนาญในการเลี้ยงช้าง อาณาจักรชาวกูย เสื่อมอำนาจลงเนื่องจากการเสียชีวิตของขุนเจือง หัวหน้าปกครอง ประกอบกับลักษณะการดำรงชีวิตของชาวกูยเอง ทำให้มีการอพยพมุ่งสู่บริเวณฝั่งขวาแม่น้ำโขงซึ่งยังเป็นป่าที่อุดมสมบูรณ์ จึงได้ข้ามแม่น้ำโขงตรงบริเวณอำเภอโขงเจียม "โขลงเจียม" เป็นภาษากูยแปลว่าโขลงช้าง (ภาษากูยเรียกช้างว่า "เจียง") (สิริวัฒน์ คำวันสา, 2524) แล้วอพยพมาทางทิศเหนือเรื่อยมาถึงแม่น้ำมูล จึงได้สำรวจหาบริเวณที่ตื้นที่สุด สำหรับนำกองคาราวานข้ามแม่น้ำจึงเลือกได้ตรงแก่งที่ใหญ่ที่สุด ที่อำเภอพิบูลมังษาหาร ในปัจจุบันแก่งนี้จึงถูกเรียกมาถึงทุกวันนี้ว่า "แก่งสะพือ" ซึ่งเพี้ยนมาจากคำว่า "กะซัญปือ" เป็นภาษากูยแปลว่า "งูใหญ่" เมื่อข้ามแม่น้ำแล้วเส้นทางอพยพก็เปลี่ยนจากทิศเหนือมายังทิศตะวันตกเฉียงเหนือ และต่อมาเปลี่ยนเส้นทางไปยังทิศตะวันตกเฉียงได้เข้าสู่จังหวัดศรีสะเกษ มีการตั้งถิ่นฐานอยู่นานก่อนที่จะอพยพมาอำเภอสังขะ และจบลงที่จังหวัดสุรินทร์ ก่อนที่จะมีการกระจายไปตั้งถิ่นฐานตามจังหวัดบุรีรัมย์ อุบลราชธานีบางส่วนของจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดมหาสารคาม และบริเวณทุ่งกุลาร้องไห้ (ไพฑูรย์ มีสกุล,2531)

ลักษณะเด่นของชาวกูย คือ การปรับตัวหรือสามารถที่จะเรียนรู้เทคนิคใหม่ๆ ในอดีตชาวกูยทำไร่เลื่อนลอย ต่อมาได้หันมาปลูกข้าวและรับเอาวิธีตีเหล็กและถลุงโลหะตามแบบอินเดียมาตั้งแต่สมัยพุทธกาล รวมถึงการปรับตัวให้เข้ากับประเพณีวัฒนธรรมและภาษาพูด เช่นถ้าชาวกูยอยู่ใกล้เขมรก็จะรับวัฒนธรรมประเพณีภาษาพูดของเขมร นำมาซึ่งคำว่า "เขมรส่วย" ถ้าอยู่ใกล้ชิดกับชาวไทยอีสานก็จะรับวัฒนธรรมประเพณีและภาษาพูด พวกนี้ก็จะถูกเรียกว่า "ลาวส่วย" (Seidanfaden,1952)

ชื่น ศรีสวัสดิ์ (2529) ได้ทำการสอบถามท่านผู้รู้ที่เป็นชาวไทย-กูยหลายท่านได้รับคำตอบในลักษณะเดียวกันว่าภาษาพูดของชาวไทย-กูยกับภาษาพูดของชาวไทย-ข่า ในพื้นที่อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี และภาษาพูดของชาวไทย-โส้ ไทยแสกในเขตพื้นที่จังหวัดสกลนคร มีรากศัพท์ใกล้เคียงกันมาก บางคำสามารถสื่อความหมายกันได้โดยไม่ต้องใช้ภาษากลางเป็นสื่อ จากข้อยืนยันดังกล่าวจึงพอที่จะเชื่อได้บ้างว่าชาวไทยกูยกับชาวข่าซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในเขตป่าเขาในประเทศลาว, ประเทศเขมร และบางส่วนของประเทศไทย มีส่วนสัมพันธ์ในเรื่องชาติกำเนิดหรือเผ่าพันธุ์อย่างแน่นอน

ประวัติหมู่บ้านชาวกูยบ้านสะเดาหวาน

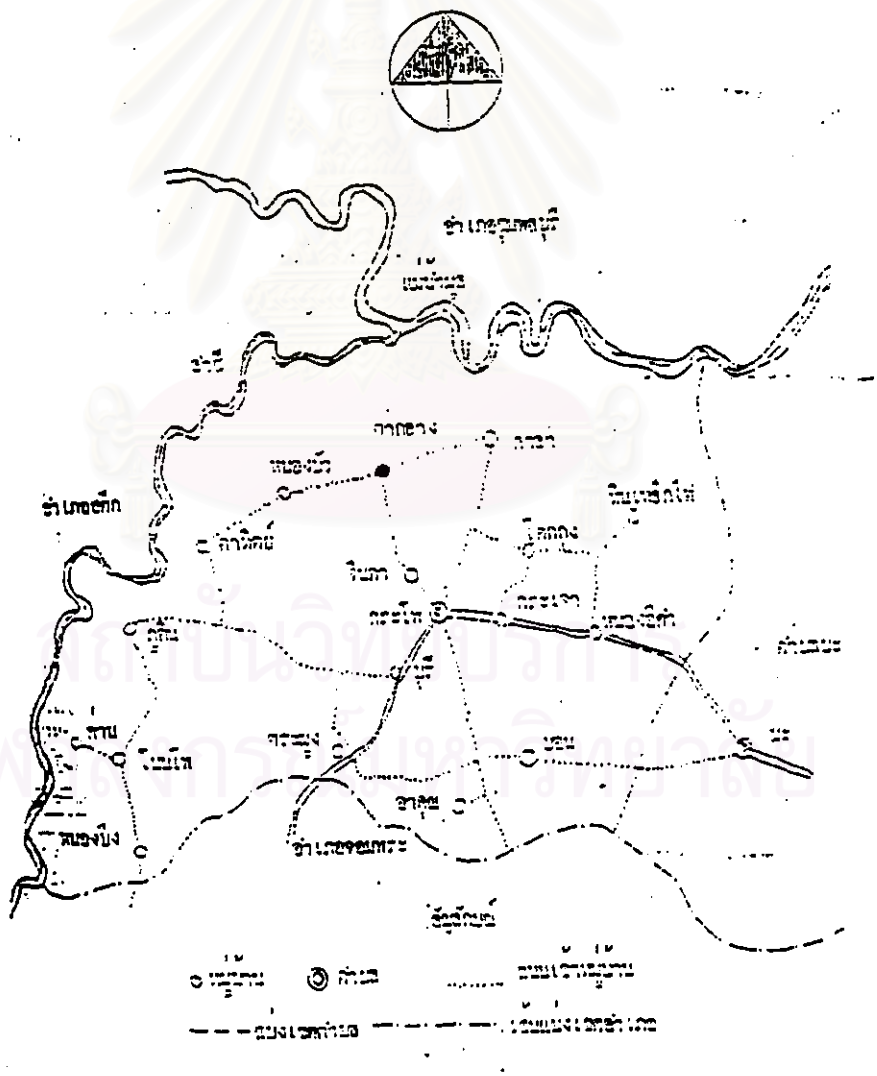
ชาวกูยบ้านสะเดาหวาน ตำบลนาภู อำเภอยางสีสุราช จังหวัดมหาสารคาม เป็นชาวกูยที่มีถิ่นฐานดั้งเดิมอยู่ที่บ้านพงพด อำเภออุทุมพรพิสัย จังหวัดศรีสะเกษ การอพยพเริ่มขึ้น เมื่อปีพุทธศักราช 2430 เนื่องจากปัญหาโจรผุกคามรวมถึงมักประสบความแห้งแล้งและเกิดโรคระบาดบ่อยครั้ง จึงได้อพยพจากบ้านพงพดสู่บ้านยางอยู่ได้เพียง 1 ปี ก็ได้อพยพต่อโดยไปตั้งถิ่นฐานที่บ้านตำแย ในอำเภอพุทไธสง ระหว่างการอพยพมีการแต่งงานกับชาวไทยลาว และพาครอบครัวอพยบมาด้วยกัน และได้อพยพต่อมายังบ้านบัวชุม สุดท้ายได้อพยพมาตั้งบ้านเรือนอยู่ที่บ้านสะเดาหวานในปัจจุบัน (ไพฑูรย์ มีสกุล, 2531)



รูปที่ 2.1 แสดงแผนที่หมู่บ้านชาวกูยบ้านสะเดาหวาน ตำบลนาภู อำเภอยางสีสุราช จังหวัดมหาสารคาม

ประวัติหมู่บ้านชาวกูยบ้านตากลาง หรือหมู่บ้านช้าง

ชาวกูยบ้านตากลาง ตำบลกระโพ อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์ เป็นชาวกูยที่อพยพมาตั้งถิ่นฐานในหมู่บ้านนี้ตั้งแต่แรกเริ่ม ต่อมาภายหลังจึงมีคนที่มีเชื้อสายไทยลาวและไทยเขมรเข้ามาอาศัยอยู่ด้วย ซึ่งเกิดจากการได้ภรรยาขณะที่มีการออกไปเที่ยวกับช้างตามจังหวัดต่างๆ ในจังหวัดสุรินทร์ มีชาวกูยที่มีอาชีพเลี้ยงช้างและไม่เลี้ยงช้าง สำหรับชาวกูยบ้านตากลางเป็นหมู่บ้านชาวกูยที่มีการเลี้ยงช้างเนื่องจากบรรพบุรุษเคยเลี้ยงช้าง และมีความผูกพันกับช้างมาก่อนไม่ว่าจะเป็นการจับช้างแล้วนำมาฝึกจนเชื่อง ตลอดจนมีการเลี้ยงไว้ใช้ในงานกิจกรรมต่างๆ ทำให้วัฒนธรรมการเลี้ยงช้างได้สืบทอดจนมาถึงรุ่นลูกหลานในปัจจุบัน (รักษพล สกุลวัฒนา, 2538)

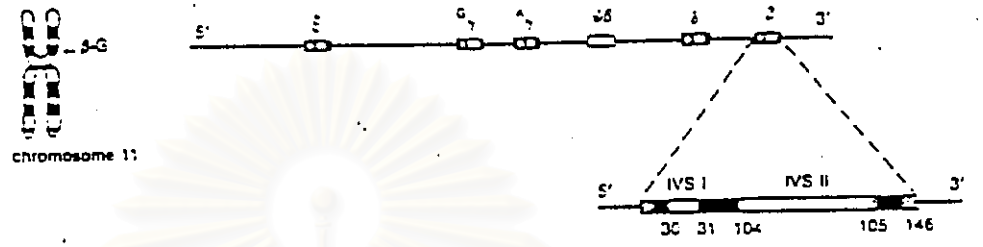


รูปที่ 2.2 แสดงแผนที่หมู่บ้านตากลาง ตำบลกระโพ อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์

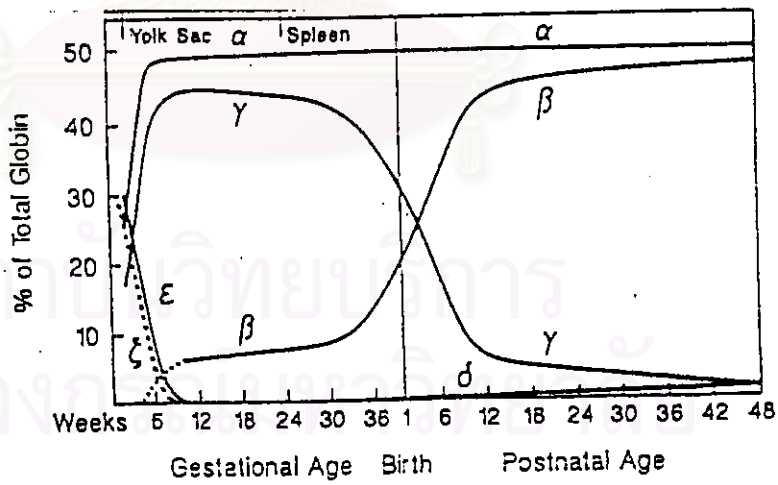
ฮีโมโกลบินและการสังเคราะห์สายโกลบิน

ฮีโมโกลบิน (hemoglobin; Hb) เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดแดงแต่ละเม็ดมีฮีโมโกลบินอยู่ประมาณ 640 ล้านโมเลกุล (Hoffbrand และ Pettit, 1993) พบว่ามีหน้าที่นำออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย ฮีโมโกลบินมีส่วนประกอบสำคัญ 2 ส่วนคือ ฮีม (heme) ซึ่งมีเหล็กเป็นส่วนประกอบหลักและโกลบิน (globin) ซึ่งเป็นสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่มีโครงสร้างแน่นอน แต่ละโมเลกุลของฮีโมโกลบินมีสายโกลบินเหมือนกัน 2 คู่ (Ingram, 1956) มารวมกันเป็นเตตระเมอร์ (tetramer) และมีฮีมฝังอยู่ในสายโกลบินทุกสาย (สุทัศน์ พู่เจริญ และ ปราณี พู่เจริญ, 2526) ฮีโมโกลบินมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันตรงชนิดสายโกลบิน ที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลฮีโมโกลบิน โดยมียีนควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินได้แก่ ยีนซีตาโกลบิน (ζ-globin) ยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 141 ตัว เป็นกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin gene cluster) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่16 แขนสั้น (16p13.3) นอกจากนี้ยังพบกลุ่มยีนบีตาโกลบินอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 แขนสั้น (11p15.5) มีขนาด 50 Kb ประกอบด้วย 6 ยีน ที่เรียงลำดับจากด้านปลาย 5' ของสายดีเอ็นเอ ไปยังปลายด้าน 3' ดังนี้ 5'- ε Gγ - Aγ - ψβ - δ - β - 3' ดังรูปที่ 2.3 (Forget และPearson,1995) โดยทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สายโกลบินต่างๆ ในช่วงอายุที่แตกต่างกัน ซึ่งประกอบด้วย ยีนเอฟซิลอนโกลบิน (ε-globin gene) ยีนแกมมาโกลบิน (γ-globin gene) ยีนเดลตาโกลบิน (δ-globin gene) และยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene) แต่ละสายโกลบิน ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินประกอบด้วยกรดอะมิโน 146 ตัว ซึ่งทำให้ได้ชนิดฮีโมโกลบินแตกต่างกัน (Perutz, 1993)

ในช่วงระยะการเจริญเติบโตของมนุษย์จากระยะตัวอ่อน (embryo) จนถึงระยะทารก (fetus) และระยะผู้ใหญ่ (adult) มีการสร้างฮีโมโกลบินแตกต่างกัน เช่น ระยะตัวอ่อน จะมีการสร้าง Hb Gower I ($\delta_2\varepsilon_2$) และ Hb Gower II ($\gamma_2\ \varepsilon_2$) ส่วนในระยะที่เป็นทารกมีการสร้าง HbF ซึ่งจะมีทั้ง ($\alpha_2G\gamma_{\ 2}$) และ ($\alpha_2A\gamma_{\ 2}$) ในสายแกมมาโกลบินตำแหน่งที่ 136 กรดอะมิโนอาจจะเป็นไกลซีน (glycine) หรืออะลานีน (alanine) ในเมื่อใกล้คลอดจะมีการสร้างสายแอลฟาและสายบีตา หลังจากคลอดพบว่ามีการสร้างสายบีตาโกลบินมากขึ้น และพบว่าการสร้างสายแกมมาโกลบินลดลง จนกระทั่งทารกมีอายุประมาณ 6 เดือน จะมีการสร้างฮีโมโกลบินแบบระยะ adult ดังรูปที่ 2.4 โดยปรกติผู้ใหญ่จะมี Hb A 97 เปอร์เซ็นต์ Hb A_2 2-3 เปอร์เซ็นต์ และ Hb F มีจำนวนน้อยมาก



รูปที่ 2.3 แสดงกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene cluster)

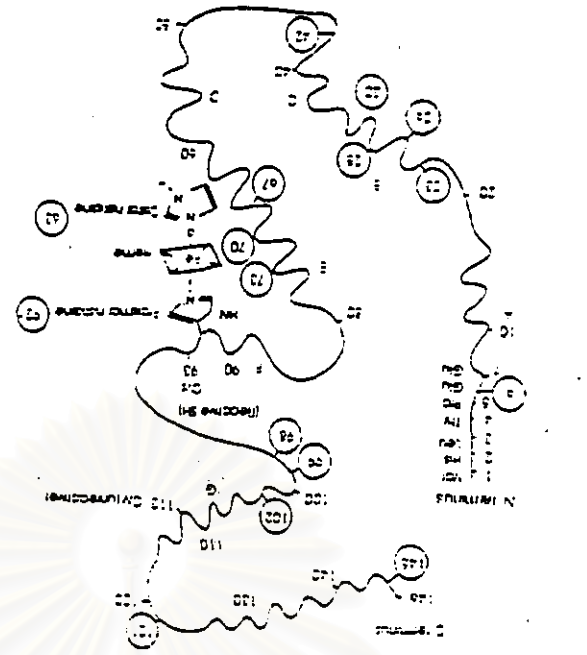


รูปที่ 2.4 แสดงปริมาณสายโกลบินที่สังเคราะห์ในช่วงอายุก่อนและหลังคลอด

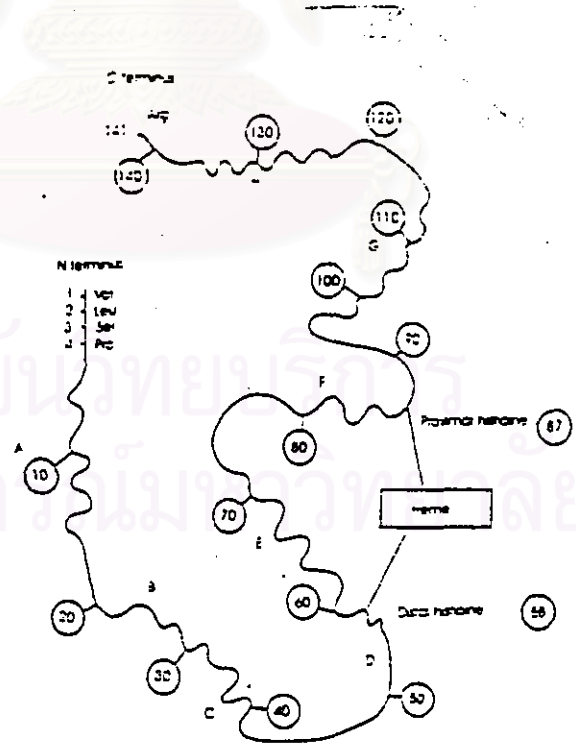
ฮีโมโกลบินผิดปรกติ (abnormal hemoglobin) เป็นความผิดปรกติที่เกิดจากการมิวเตชัน เช่น การแทนที่เบส (base substitution) การขาดของยีนบางส่วน (small deletion) และการมียีนบางส่วนแทรกเข้าไปแทนที่ (insertion) ซึ่งจะส่งผลต่อการสังเคราะห์สายโกลบิน ทำให้ลำดับกรดอะมิโนแตกต่างไปจากฮีโมโกลบินปรกติ โดยมีความผิดปรกติทั้งในด้านโครงสร้างของสายโกลบินและการจับออกซิเจน มีผลทำให้โมเลกุลฮีโมโกลบินไม่เสถียร ฮีโมโกลบินผิดปรกติที่ตรวจพบมีประมาณ 700 ชนิด โดยพบว่าเป็น α-chain variant ประมาณ 200 ชนิด และ β-chain variant ประมาณ 340 ชนิด (วิชัย เหล่าสมบัติ, 2541)

ปัจจุบันในประเทศไทยพบฮีโมโกลบินผิดปรกติหลายชนิด เช่น ฮีโมโกลบินมหิดล (Hb Mahidol) ฮีโมโกลบินขอนแก่น (Hb KhonKaen) ฮีโมโกลบินตาก (Hb Tak) ฮีโมโกลบินไพรกอส (Hb Pyrgos) แต่ที่พบบ่อยและมีอุบัติการสูงคือฮีโมโกลบินอี (Hb E) เป็นความผิดปรกติบนยีนบีตาโกลบินที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26 เปลี่ยนจากกลูตามิค (glutamic) เปลี่ยนไปเป็นไลซิน (lysine) ผลทำให้ฮีโมโกลบินไม่เสถียร แต่ฮีโมโกลบิน Constant Spring (Hb CS) เป็นความผิดปรกติที่ยีนแอลฟ่าโกลบิน โดยที่สายโกลบินมีจำนวนกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น 31 ตัว จากเดิม 141 ตัว ทำให้สายโกลบินมีจำนวนกรดอะมิโน 172 ตัว ส่งผลทำให้ฮีโมโกลบินไม่เสถียร (Clegg และ Weatherall, 1974)

ธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นโรคชนิดหนึ่งที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดความผิดปรกติที่ทำให้มีการสังเคราะห์สายโกลบินลดลงหรือสร้างสายโกลบินไม่ได้เลย เดิมโรคนี้เรียกว่า Cooley's Anemia (Whipple และ Bradford, 1932) โดยปรกติในเม็ดเลือดแดงของผู้ใหญ่ประกอบด้วยฮีโมโกลบินเอเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยสายแอลฟ่าโกลบินและสายบีตาโกลบิน ปัญหาส่วนมากจึงพบได้ 2 ลักษณะ คือ แอลฟ่าธาลัสซีเมีย (α-thalassemia) เป็นการสร้างสายแอลฟ่าโกลบินผิดปรกติ และบีตาธาลัสซีเมีย (β-thalassemia) เป็นการสร้างสายบีตาโกลบินผิดปรกติ



รูปที่ 2.5 แสดงแบบจำลองโครงสร้างของสายบีตาโกลบินของคนปรกติ



รูปที่ 2.6 แสดงและจำลองโครงสร้างของสายแอลฟาโกลบินของคนปรกติ

ฮีโมโกลบินอี (HbE)

ฮีโมโกลบินอี (HbE) เกิดจากความผิดปรกติของยีนบีตาโกลบิน ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26 เดิมมีรหัสเป็น GAG ซึ่งแปลระหัสเป็นกรดอะมิโนกลูตามิดเปลี่ยนไปเป็น AAG ซึ่งแปลระหัสเป็นกรดอะมิโนไลซีน ($\alpha_2\beta_2^{26Glu \longrightarrow Lys}$) และเกิดการกระตุ้น cryptic splice site ที่ตำแหน่งของ GGT ในโคดอนที่ 25 ทำให้ RNA บางส่วนที่สร้าง exon 1 ของ β-globin gene ถูกตัดออกไปที่ตำแหน่ง codon 25 พร้อมกับบางส่วนของ intron ทำให้ RNA ผิดปรกติ โดยที่ exon 1 มีเบสขาดหายไป 16 เบส ทำให้มี terminator เกิดขึ้นในส่วนของ exon 2 จึงไม่สามารถสร้างสายบีตาโกลบินได้ แต่เนื่องจากตำแหน่งของ splice site ปรกติ การเกิด splicing ยังคงปรกติ จึงยังคงสร้าง β-mRNA และ β-globin chain อยู่ แม้จะพบว่าสายบีตาที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26 ยังสร้างเป็นไลซินอยู่ก็ตาม HbE จึงมีคุณสมบัติคล้ายกับว่าเป็น β^+-thalassemia (Okin และคณะ,1982) HbE มีความเสถียรต่ำกว่าโมเลกุลฮีโมโกลบินเอ (HbA) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินปรกติ

Chernoff, Minnich และ Chongcharoensuk (1954) ได้พบฮีโมโกลบินอีในชาวไทยเป็นครั้งแรก โดยทั่วไปพบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งจะพบค่อนข้างจำเพาะในบริเวณนี้ (Flatz,1967)

HbE ถูกพบได้มากในกลุ่มชนที่พูดภาษาตระกูลมอญ-เขมร ซึ่งเชื่อว่าเป็นชนพื้นเมืองดั้งเดิมของเอเชียอาคเนย์ มีความถี่แปรผันอยู่ในช่วง 0 ถึงมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ในพวกเซดาง เวียดนาม ขมุ และละว้า พบความถี่ค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 0 ถึง 10 ในพวกเขมรสูง ซึ่งได้แก่ กลุ่มชาติพันธุ์ต่างๆ ที่รวมเรียกว่า ข่า หรือม้อย ที่อพยพจากตอนใต้ของประเทศลาว และตอนบนที่ราบสูงภาคกลางของประเทศเวียดนาม รวมถึงชาวกูยและโส้ซึ่งเป็นเขมรสูงที่อพยพเข้ามาจากภาคใต้ของประเทศลาว พบความถี่สูงมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (เสมอชัย พูลสุวรรณ, 2536)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยพบมีอุบัติการฮีโมโกลบินอีสูง โดยเฉพาะในแถบรอยต่อระหว่างไทย ลาว และกัมพูชา ฮีโมโกลบินอีที่พบบริเวณนี้ จึงถูกเรียกว่า "HbE triangle" ในประเทศไทยจะพบเพียง ร้อยละ 13% (Nanakorn และ Wasi, 1978) ในชนกลุ่มน้อยที่แยกตัวออกมา (isotate tribe) จะพบ HbE สูงมากในประชากรชาวภูไท อำเภอพรรณานิคม จังหวัดสกลนคร พบ HbE คิดเป็น ร้อยละ 42.78 ส่วนชาวโส้ อำเภอกุสุมาลย์ จังหวัดสกลนคร คิดเป็น ร้อยละ 73.65 (Sriboonlue และคณะ, 1985) และในจังหวัดบุรีรัมย์พบ HbE สูงถึง ร้อยละ 49.97 ของประชากร

(พรรณี ชิโนรักษ์ และมุกดา ภูหิรัญ, 2534) แต่จะไม่พบ HbE ในชาวเขาเผ่าแม้ว ลีซอ มูเซอ อีก้อ กะเหรี่ยง (ประเวศ วะสี, 2534)

โครงสร้างของสายโกลบินประกอบด้วยกรดอะมิโนต่อกัน กรดอะมิโนแต่ละโมเลกุลนั้นมีประจุต่างกัน เป็นผลให้ประจุสุทธิของฮีโมโกลบินต่างกัน จากคุณสมบัตินี้จึงสามารถแยกชนิดของฮีโมโกลบินได้ โดยทั่วไปจะให้ฮีโมโกลบินวิ่งเข้าไปในสนามไฟฟ้าที่มีพีเอช (pH) มากกว่าพีไอ (pI) ของฮีโมโกลบิน ซึ่งจะส่งผลให้ฮีโมโกลบินทุกชนิดมีประจุเป็นลบ โดยทำให้ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดมีการเคลื่อนที่แตกต่างกันตามประจุสุทธิของฮีโมโกลบินนั้นๆ ทำให้แยกชนิดของฮีโมโกลบินได้

ปัจจุบันนิยมแยกชนิดของฮีโมโกลบินโดยใช้ 2 วิธี ซึ่งแตกต่างกันที่ตัวกลางที่ใช้แยกชนิดของฮีโมโกลบิน คือ

- Starch gel electrophoresis เป็นวิธีที่สามารถแยกชนิดของฮีโมโกลบินได้ดี แต่ปัจจุบันไม่ค่อยนิยมใช้เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเตรียมเจลแป้ง ซึ่งใช้เป็นตัวกลาง

- Cellulose acetate electrophoresis ปัจจุบัน cellulose acetate electrophoresis ถูกนำมาใช้มากเพราะมีความสะดวกโดยมีแผ่นตัวกลางคือ cellulose acetate strip เป็นตัวกลางในการแยกชนิดของฮีโมโกลบินทำให้มีความแม่นยำ (กุลนภา ฟู่เจริญ และคณะ, 2539)

การแยกฮีโมโกลบินชนิด HbCS โดยวิธีนี้ จะต้องอาศัยความชำนาญ เนื่องจากถ้าใช้น้ำละลายฮีโมโกลบินน้อยอาจจะทำให้ตรวจไม่พบได้ รวมถึงคุณสมบัติของสีย้อม Ponceau S ซึ่งใช้ย้อมแถบฮีโมโกลบินบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตทสามารถติดกับโปรตีนชนิดอื่น เช่น แถบของเอนไซม์ carbonic anhydrase ซึ่งจะปรากฏเป็น 2 แถบ โดยจะอยู่ระหว่างบริเวณที่หยดน้ำละลายฮีโมโกลบินซึ่งเป็นตำแหน่งเริ่มต้น (origin) กับแถบของ HbA_2 ซึ่งจะทำให้อ่านผลผิดอ่านเป็นฮีโมโกลบิน Hb CS (เยาวลักษณ์ วิลัย, 2538)

สำหรับการตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินในประชากรชาวกูยครั้งนี้ เลือกใช้วิธี cellulose acetate electrophoresis และเทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (PCR)

PCR ถูกพบครั้งแรก โดย K. Mullis ในปี 1985 เป็นวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการให้มีปริมาณมากในหลอดทดลอง โดยอาศัยไพรเมอร์ (primer) 2 ชนิด ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) สายสั้นประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ สังเคราะห์ขึ้นโดยให้มีลำดับเบสที่สามารถไปจับกับตำแหน่งดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด จะมีทิศทางตรงข้ามกัน ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation คือ ขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอเริ่มต้น หรือ template ซึ่งเป็นสายคู่แยกออกจากกันโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 ^{0}C

2. Annealing คือ ขั้นตอนการจับกันระหว่างไพรเมอร์ที่มีเบสคู่สม (complementary) กับสายดีเอ็นเอที่แยกเป็นสายเดี่ยว (single strand)

3. Primer extension คือ ขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอ เส้นใหม่โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบที่มีไพรเมอร์จับอยู่แล้วและมีการสร้างต่อจากไพรเมอร์ โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งมีทิศทางจาก 5' ไปทางด้าน 3' เสมอ และมีดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxyribonecleotide triphosphate) ทั้ง 4 ชนิด (dGTP dATP dCTP dTTP) เป็น substrate ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนที่ 3 จะได้ปริมาณเพิ่มขึ้น 2 ชุด จากเดิมมีเพียง 1 ชุด โดยที่ดีเอ็นเอบริเวณอื่นที่นอกจากบริเวณนี้ ยังคงมีประมาณเท่าเดิม ดีเอ็นเอทั้งสองชุดจะกลายเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในแต่ละรอบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อแทน n ด้วยรอบปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีปริมาณเป็น 2^{n} จากหลักการนี้ จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ ให้มีปริมาณมากๆได้ ดังรูปที่ 2.7

ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำในหลอดทดลองขนาดเล็กที่มีความจุประมาณ 0.2-0.5 µl เพียง 1 หลอด โดยจะประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ dNTP ไพรเมอร์ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ Mg^{2+} และเอนไซม์ DNA polymerase เดิมระยะแรกใช้เอนไซม์ E. coli DNA polymerase I หรือ Klenow fragment ซึ่งทำงานได้ดีในอุณหภูมิ 37 ^{0}C เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานหมดไป (heat labile)

ปัจจุบันจึงนิยมใช้เอนไซม์ทนความร้อน (thermostable DNA polymerase) ซึ่งแยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* และรู้จักทั่วไปว่า Taq DNA polymerase ทำงานได้ดีในอุณหภูมิ 70 °C ทนความร้อนได้ในอุณหภูมิที่ 94-95 °C เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า Klenow fragment มาก

ปัจจุบันเทคนิค PCR ได้มีการพัฒนาเพื่อให้มีความเหมาะสม และรวดเร็วกับการใช้งานต่างๆ ตามวัตถุประสงค์ เช่น ได้มีการพัฒนาการตรวจหาฮีโมโกลบินผิดปรกติให้มีความแม่นยำมากขึ้น โดยได้นำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ เช่น ใช้เทคนิค ASPCR กับยีน HbC (Fischel Hirsch และ Bohlman , 1990) ยีน HbE (Fucharoen และคณะ, 1994) และยีน Hb Tak (Fucharoen และคณะ, 1997)

วิธี ASPCR หรือ Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

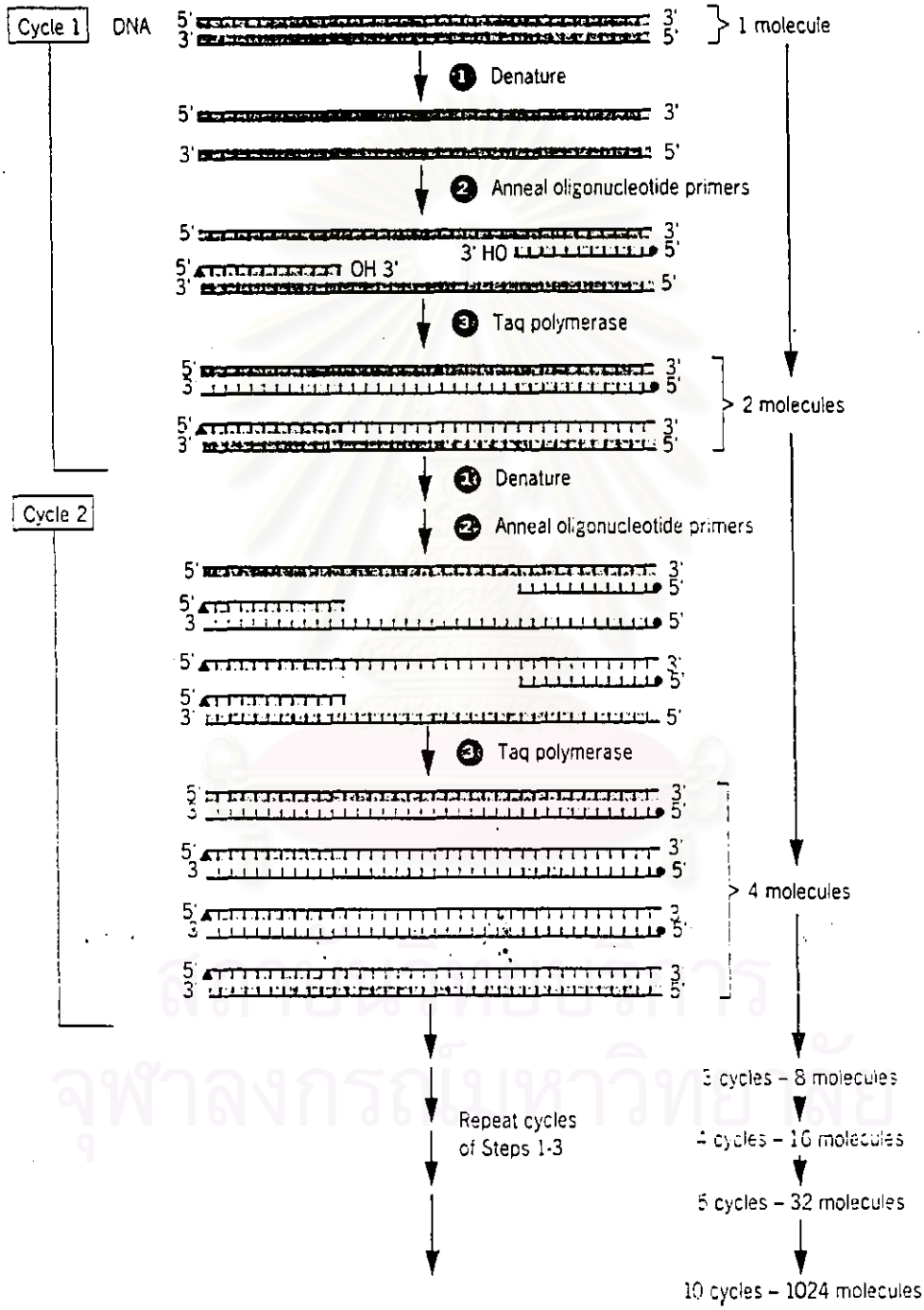
ASPCR เป็น PCR ชนิดหนึ่ง ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการหาตำแหน่งผิดปรกติ โดยจะต้องทราบตำแหน่งที่มิวเตชัน โดยอาศัยไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจะต้องมีความจำเพาะต่อตำแหน่งมิวเตชันนั้นๆ โดยให้เบสที่จำเพาะต่อตำแหน่งมิวเตชันนั้น ออกแบบให้อยู่ที่ปลายทางด้าน 3' ของไพรเมอร์ มิวเตชันแต่ละชนิดจะมีไพรเมอร์ที่จำเพาะต่ออัลลีลผิดปรกตินั้น การตรวจสอบใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่ออัลลีลปรกติ (common primer) กับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อมิวเตชัน (allele specific primer) ในปฏิกิริยา PCR เมื่อไพรเมอร์จำเพาะไปจับกับดีเอ็นเอของคนปรกติ จะไม่สามารถจับแบบสมบูรณ์กับปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์ได้ โดยไพรเมอร์นี้จะเปิดขึ้น ทำให้นิวคลีโอไทด์ตัวแรกไม่สามารถถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ โดยที่นิวคลีโอไทด์ตัวแรก ไม่สามารถจะไปต่อจากด้าน 3' ของสาย รวมทั้ง Taq polymerase ขาดคุณสมบัติจาก 3' → 5' exonuclease จึงไม่สามารถตรวจสอบความถูกต้องในการสังเคราะห์ (DNA proofreading) ในขณะเดียวกัน ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งมิวเตชัน เมื่อนำไปใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของคนปรกติจะไม่มีการสังเคราะห์ เมื่อนำส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา ASPCR ไปตรวจสอบโดย gel electrophoresis จะทำให้ทราบว่ามีมิวเตชัน ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ทราบความผิดปรกติของยีนได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ เพราะสามารถตรวจสอบความผิดปรกติในระดับเบสเพียงเบสเดียว (point mutation)

Hb Pyrgos และเทคนิค ASPCR

ฮีโมโกลบินไพรกอส (Hb Pyrgos) เป็นฮีโมโกลบินผิดปรกติที่เกิดจากสายบีตาโกลบินที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 83 เดิมรหัสเป็น GGC ซึ่งแปลรหัสเป็นไกลซีน (glycine) เปลี่ยนไปเป็น GAC ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแอสปาติค (aspartic) ($\alpha_2\beta_2^{83\ Gly \longrightarrow Asp:GGC \longrightarrow GAC}$) เป็นผลทำให้เกิดฮีโมโกลบินไม่เสถียร โดยพบครั้งแรกในเด็กชายอายุ 3 ขวบชาวกรีก (Tatis,Koula และ Constaine, 1976)

Fucharoen และคณะ (1997) ได้ศึกษาชนิดฮีโมโกลบินในคนที่มาตรวจสุขภาพในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบฮีโมโกลบินผิดปรกติชนิดหนึ่ง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเซลลูโลสอะซิเตทอิเล็คโตรโฟเรซีส พบว่าเคลื่อนที่เร็วกว่า HbA แต่จะช้ากว่า Hb Bart's เมื่อทำการศึกษาในลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีการเปลี่ยนจากเบส G ไปเป็น A (GGC → GAC) ที่ codon 83 และทำการตรวจสอบฮีโมโกลบินผิดปรกติโดยวิธี ASPCR ทำให้ทราบแน่ชัดว่าเป็น HbPyrgos เมื่อนำไปศึกษาแฮปโพลไทป์พบว่าเป็นแบบ (+-----+)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.7 แสดงหลักการการเกิดปฏิกิริยา PCR

ยีน HbE และการศึกษาแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน

Hemoglobin E (HbE) เกิดจากความผิดปกติในระดับโครงสร้างของฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดมิวเตชันในโคดอนที่ 26 มีผลต่อการสร้าง β-mRNA ลดลงคล้ายกับว่าเป็น β^{+}-thalassemia แต่ไม่แสดงอาการในคนที่เป็น heterozygote และ homozygote เว้นแต่จะมี β-thalassemia ร่วมด้วยจึงปรากฏอาการชัดเจน β^{+}thalassemia/HbE หรือ β^{0}-thalassemia/HbE เป็นอัลลีลผิดปรกติบนตำแหน่งยีนเดียวกัน โดยเป็นเฮทเตอโรไซโกต เฮทเตอโรไซโกตแบบนี้มีโอกาสที่จะอยู่รอดและเจริญต่ำกว่าคนปรกติ จะเกิดการคัดเอาอัลลีลทั้งสองที่ผิดปรกติออกไปจากประชากรพร้อมกัน ในขณะเดียวกันกับพบว่าอัลลีลผิดปรกติเหล่านี้สามารถต้านทานต่อการเจริญของเชื้อมาลาเรียได้ ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ ความถี่ของความผิดปรกติในประชากรจึงสามารถถูกกำหนดให้เปลี่ยนแปลงเข้าสู่สมดุลภายใต้การคัดเลือก (Poolsuwan,1991 อ้างใน เสมอชัย พูลสุวรรณ, 2536)

Flatz (1967) ได้ศึกษาความถี่ของ HbE ในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเชื่อว่า น่าจะมีสาเหตุมาจากการเกิดมิวเตชัน จาก HbA เปลี่ยนไปเป็น HbE รวมทั้งการมี selection ต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียชนิดร้ายแรงในมนุษย์ เชื้อชนิดนี้จะเจริญได้ไม่ดีในคนที่มี HbE แต่เจริญได้ดีในคนปรกติ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ HbE ในกลุ่มประชากร

Sriboonlue และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาฮีโมโกลบินอีในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย โดยเฉพาะในจังหวัดสุรินทร์พบ HbE สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในประชากรชาวภูไทย และในจังหวัดสกลนครพบ HbE ได้สูงเช่นเดียวกัน

Wasi และ Nanakorn (1967) ได้ศึกษาประชากรในจังหวัดอุบลราชธานี ขอนแก่น และอุดรธานี จำนวน 1,030 ราย พบว่าความถี่ยีนฮีโมโกลบินอีสูงถึง 0.446 0.433 และ 0.368 ตามลำดับ ความถี่ยีนฮีโมโกลบินอีทั้งหมด คิดเป็น 0.420 แต่พบว่าคนจีนในประเทศไทย พบความถี่ยีนต่ำกว่า 0.1

ไทยพวนเป็นกลุ่มชาติพันธุ์ไทย-ลาวกลุ่มหนึ่งที่อยู่ในจังหวัดลพบุรี พบความถี่ยีนฮีโมโกลบินอี 0.129 (อุรศรี สุยะศุนานนท์, 2539) และในลาวโซ่ง จังหวัดสุพรรณบุรี พบความถี่ยีนฮีโมโกลบินอี 0.05 (กษม อายุการ, กุลนภา ฟู่เจริญ และสุพรรณ ฟู่เจริญ, 2539)

แต่ชาวชองในจังหวัดจันทบุรี ที่มีภาษาพูดจัดอยู่ในตระกูลมอญ-เขมรพบความถี่ยีนฮีโมโกลบินอีสูงถึง 0.589 (เยาวลักษณ์ วิลัย,2538)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์ไทย-ลาว พบว่ามีความใกล้ชิดที่สุดกับชาติพันธุ์มอญ-เขมร (เสมอชัย พูลสุวรรณ , 2536)

ตารางที่ 2.1 แสดงการกระจายของฮีโมโกลบินอีและความถี่ของยีนในกลุ่มชาติพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย

กลุ่มชาติพันธุ์	จำนวนคน	EA	EE	EE(%)	HbE gene frequency
ไทย					
ภาคเหนือ	31	3	-	9.7	0.05
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	235	61	4	27.9	0.15
ชนกลุ่มน้อย					
ชาวเขา	79	2	-	2.5	0.01
ภูไท	31	13	3	51.6	0.31
ชอง	50	24	18	84.0	0.60
ลาวโซ่ง	58	5	-	8.6	0.05
ซาไก	34	3	-	11.8	0.06

ที่มา : (Fucharoen และคณะ, 1997)

นักวิชาการเชื่อกันว่าชนพื้นเมืองดั้งเดิมของเอเชียอาคเนย์ได้แก่ กลุ่มชนที่พูดภาษาตระกูลมอญ-เขมรพบว่ามีความถี่ยีนฮีโมโกลบินอีสูงเสมอ ฮีโมโกลบินอีอาจมีต้นกำเนิดในชนกลุ่มนี้ ส่วนกลุ่มอื่นสันนิษฐานว่าอาจจะอพยพเข้ามาภายหลัง โดยเฉพาะกลุ่มชาติพันธุ์ไทย-ลาวจะพบฮีโมโกลบินอีในระดับความถี่ต่ำกว่า ความหลากหลายของความถี่เริ่มต้นของฮีโมโกลบินอีสามารถใช้ดูทิศทางการกระจายของกลุ่มชนและการผสมผสานระหว่างกลุ่มประชากรได้ (เสมอชัย พูลสุวรรณ , 2536)

Antonarakis และคณะ (1985) จากบทความชื่อ "DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster" ในแต่ละบุคคลลักษณะพันธุกรรมจะแตกต่างกัน มีการถ่ายทอดจากบุคคลหนึ่งไปยังอีกบุคคลหนึ่งได้ ความแตกต่างของพันธุกรรมแต่ละบุคคลเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงในระดับ DNA โดยมีปรากฏการณ์ common silent หรือ neutral variation ทำให้เกิด DNA polymorphism

DNA polymorphism ในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน สามารถตรวจสอบได้ 2 วิธี คือ วิธีแรก หาลำดับเบสโดยโดยตรงชิ้น DNA ที่เราต้องการศึกษา วิธีที่สองใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการทำ gene mapping ซึ่งดีเอ็นเอจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความยาวแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล ซึ่งเป็นความผันแปรในระดับดีเอ็นเอ

Lawn และคณะ (1980) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ β-globin gene เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์กับ β–like globin gene และใช้เป็นพื้นฐานในการเปรียบเทียบยีนบีตาโกลบินปกติกับบีตาโกลบินผิดปกติ รวมทั้งศึกษาความบกพร่องของยีนที่มีผลต่อการแสดงออกของฮีโมโกลบิน

Lawn และคณะ (1978) ได้ทำการศึกษา DNA polymorphism ภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน โดยเทคนิค RFLP จนกระทั่งปัจจุบันพบว่ามี polymorphism ถึง 17 ตำแหน่ง ในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (Orkin และคณะ, 1982) การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ถ้าตัดได้เป็น + (presence) หรือตัดไม่ได้เป็น - (absence) ที่ตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซมแท่งหนึ่งทำให้รูปแบบการตัดแตกต่างกัน ซึ่งจะเรียกว่า แฮปโพลไทป์ (haplotype)

Frameworks (FW) ถูกจำแนกได้โดยการตัดได้ (+) และการตัดไม่ได้ (-) ในตำแหน่ง *Ava* II ในส่วนของ intervening sequence 2 (IVS-2) ของยีนบีตาโกลบิน และตำแหน่งของ B*am*H I ที่อยู่ระหว่างปลาย 3' จนถึงตำแหน่งยีนบีตาโกลบิน ถ้าตำแหน่ง polymorphic site 2 ตำแหน่ง มีความสัมพันธ์แบบสุ่ม โอกาสของการตัดได้ใน 2 ตำแหน่งที่เป็น (+ +) ความน่าจะเป็นของการตัดได้ทั้งสองตำแหน่งต้องเท่ากัน ถ้า polymorphic site ตำแหน่งที่ 1 สามารถถูกตัดได้ 50 % ของโครโมโซม polymorphics site ตำแหน่งที่ 2 สามารถถูกตัดได้ 30 % จากทฤษฎีความน่าจะเป็นกรณีที่ทั้งสองตำแหน่งถูกตัดได้ในโครโมโซมจะ = 50% x 30% = 15% แต่ถ้ามีความสัมพันธ์

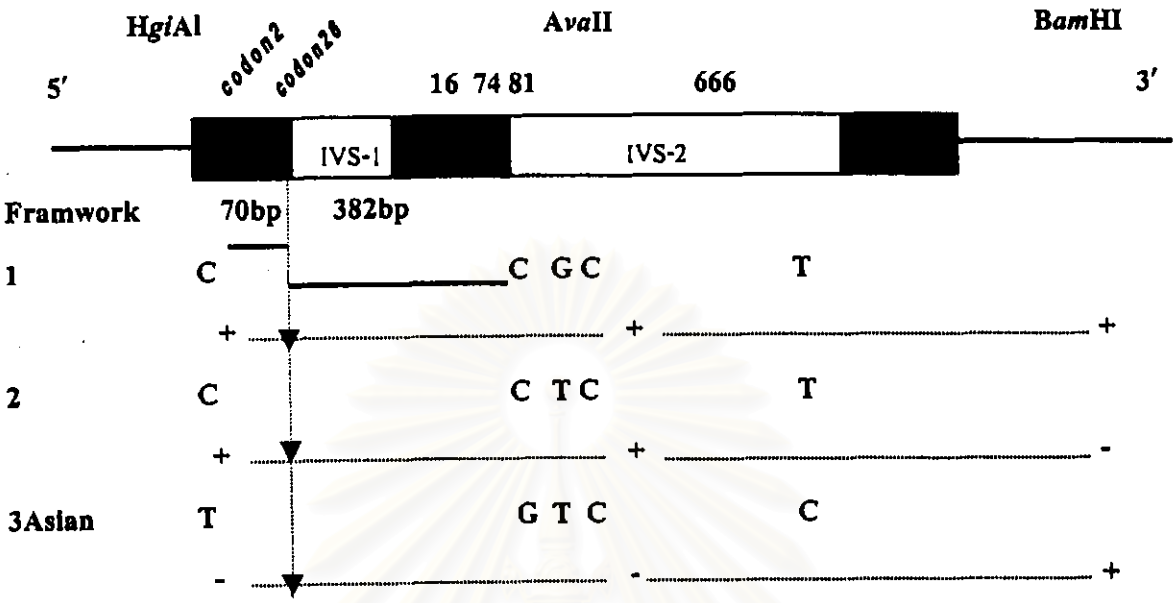
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบ nonrandomly ความน่าจะเป็นของการตัดได้ทั้งสองตำแหน่ง จะแตกต่างจากที่คาดหมาย (Antonarakis, Kakazian และ Orkin, 1985)

Antonarakis และคณะ (1982) ได้จัดรูปแบบ FW เป็น 3 รูปแบบดังนี้ คือ FW 1 (*Ava*II + *Bam*H I+) FW2 (*Ava* II + *Bam*H I -) และ FW 3 (*Ava* II- *Bam*HI+) ซึ่ง Hundrieser และคณะ (1988ab) กับ Anatonarakis และคณะ (1982) มีความเห็นสอดคล้องกันคือไม่พบรูปแบบของ FW ที่เป็นแบบ (*Ava* II - *Bam*H I-)

β-globin gene frameworks มีความแตกต่างกันในลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้ได้รูปแบบ frameworks ที่ได้แตกต่างกันไป โดย FW1 และ FW2 แตกต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งที่ 74 ซึ่งจะพบในชาวคอเคเซี่ยน (CaucAsian) และชาวเอเซี่ยน (Asian) FW3 (Asian) และ FW2 แตกต่างกัน โดยมีการเปลี่ยนแปลง 3 นิวคลีโอไทด์ โดยเกิดที่ตำแหน่ง codon ที่ 2 ของ exon 1 และบริเวณ IVS-2 ที่ตำแหน่ง 16 และตำแหน่ง 666 กลไกสำคัญที่ทำให้ประชากรในบริเวณเดียวกันมี β-globin gene frameworks ต่างกันน่าจะเกิดจาก 1) crossing over 2) separate mutation และ 3) gene conversion (Antonarakis และคณะ, 1982) และยังสรุปว่าการเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก FW 2 ไปเป็น FW 3 หรือ FW 3 ไปเป็น FW 2 นั้นจะต้องเกิด crossing over ถึง 2 ครั้ง โดยอาศัยการเกิดในช่วง 382 นิวคลีโอไทด์ เริ่มจากโคดอนที่ 26 ตลอดจนถึงตำแหน่ง *Ava* II site ในบริเวณ IVS-2 ซึ่งเป็นช่วงสั้นมากสำหรับการเกิด crossing over ดังนั้น สรุปว่าการมี β-globin gene frameworks ต่างกัน แสดงว่ายีนบีตาโกลบินมีต้นกำเนิดต่างกัน (independent origin) แต่ถ้ามี β-globin gene frameworks เหมือนกัน แสดงว่ายีนบีตาโกลบินมีต้นกำเนิดเดียวกัน (dependent origin)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.8 ไดอะแกรมโครงสร้างของยีนบีตาโกลบิน แสดงชนิด β-globin gene frameworks ที่แตกต่าง กันในลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยที่ FW1 และ FW2 แตกต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ ใน ตำแหน่งที่ 74 ของ IVS-2 พบในชาวเคอเคเซี่ยนและชาวเอเซี่ยน สำหรับ FW3 (Asian) มีการ เปลี่ยนแปลง 3 นิวคลีโอไทด์ จาก FW2 โดยเกิดที่ตำแหน่งโคดอนที่ 2 ของ exon 1 และ บริเวณ IVS-2 ที่ตำแหน่ง 16 และ ตำแหน่ง 666

เครื่องหมาย ▼ หมายถึงตำแหน่งของยีนบีตาอี, (+) และ (-) หมายถึง การตัดได้และตัดไม่ ได้ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ บน polymorphic restriction sites

■ = exon และ □ = introns หรือ intervening sequence (IVS)

Antonarakis และคณะ (1982a) ให้ความหมายของ haplotype ว่า "the pattern or combination of polymorphic restriction sites for any chromosome" ถ้ากำหนดให้ n แทนจำนวนของ polymorphic restriction sites ดังนั้นจะมีจำนวนรูปแบบของแฮปโพลไทป์ที่เป็นไปได้ถึง 2^n รูปแบบ เช่นมี polymorphic restriction sites 8 ตำแหน่ง ถ้าหากมีความสัมพันธ์แบบสุ่มโอกาสที่จะพบแฮปโพลไทป์ได้ถึง $2^8 = 256$ แบบ แต่ในความเป็นจริงกลับพบแฮปโพลไทป์เพียงไม่กี่รูปแบบเท่านั้น ชี้ให้เห็นว่าไม่ใช่ความสัมพันธ์แบบสุม ทั้งนี้เนื่องจากการมี linkage disequilibrium

Okin และคณะ (1982) ได้ศึกษา DNA haplotype ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินโดยอาศัย polymorphic restriction sites หลายตำแหน่ง ปัจจุบันได้มีการศึกษากลุ่มยีนบีตาโกลบินที่ประกอบด้วย polymorphic restricttion sites 7 ตำแหน่ง ประกอบด้วยตำแหน่งที่ 1 5' ε-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 2 Gγ-*Hin*dIII ตำแหน่งที่ 3 Aγ-*Hin*dIII ตำแหน่งที่ 4 ψβ-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 5 3' ψβ-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 6 β-*Ava*II และตำแหน่งที่ 7 3' β–*Bam*HI polymorphic restriction sites ทั้ง 7 ตำแหน่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 จากปลายดีเอ็นเอด้าน 5' ไปถึงยีนบีตาโกลบิน เรียกว่า 5' haplotype และส่วนที่ 2 จากปลายดีเอ็นเอด้าน 3' จนถึงยีนบีตาโกลบินเรียก 3' haplotype หรือ β-globin gene frameworks (FW) พบว่า polymorphic sites ทั้ง 5 ตำแหน่ง ในส่วนของปลายดีเอ็นเอด้าน 5' ตลอดจนถึงตำแหน่งของบีตาโกลบิน โดยเริ่มต้นจากตำแหน่ง *Hin*cII site จนถึงตำแหน่ง *Hin*dIII site มีความสัมพันธ์กันแบบ nonrandomly และพบอีกว่าจากปลายดีเอ็นเอด้าน 3' จนถึงส่วนของยีนบีตาโกลบิน ที่มีตำแหน่ง polymorphic sites 2 ตำแหน่ง คือ A*va*II site และ B*am*HI site มีความสัมพันธ์แบบ nonrandomly ช่วงระหว่างส่วน 5' haplotype และส่วนของ 3' haplotype มีความเป็นอิสระต่อกัน (independent association) เนื่องจากเป็นบริเวณที่เกิด recombination ได้ง่าย เรียกบริเวณส่วนนี้ว่า "hot spot region" มีช่วงความยาวดีเอ็นเอประมาณ 9.0 กิโลเบส (Chakravarti และคณะ,1984) ทำให้ได้แฮปโพลไทป์ต่างกัน ลักษณะแฮปโพลไทป์บางครั้งสามารถสะท้อนให้เห็นการมีอยู่ของยีน β-thalassemia ในประชากรได้

Fukumaki และ Fucharoen (1991) ได้ทำการศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินโดยวิธี PCR และเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ตำแหน่งโพลีมอร์ฟิก 7 ตำแหน่ง ประกอบด้วยตำแหน่งที่ 1 5' ε-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 2 Gγ -*Hin*dIII ตำแหน่งที่ 3 Aγ -*Hin*dIII ตำแหน่งที่ 4 ψβ-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 5 3' ψβ-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 6 β-*Ava*II และตำหน่งที่ 7 3' β–*Bam*HI

Kazazian และคณะ (1984) ได้ศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของฮีโมโกลบินอีในครอบครัวที่เป็นต้นกำเนิดของชาวยุโรป จากคนที่มี HbE แบบ heterozygote พบว่าลักษณะแฮปโพลไทป์ของครอบครัวนี้ไม่เหมือนกับที่พบประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แสดงให้เห็นว่า β^E-globin gene ในประชากร มี multiple independent origins การที่พบแฮปโพลไทป์มากกว่าหนึ่งรูปแบบในประชากรหนึ่ง เชื่อได้ว่าน่าเกิดจาก 1) meiotic recombination จากดีเอ็นเอทางด้านปลาย 5' ไปจนถึงยีนบีตาโกลบิน 2) a specific interallelic conversion

Antonarakis และคณะ (1982b) ได้ศึกษาต้นกำเนิดของยีนบีตาอีโกลบินของประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยทำการศึกษาประชากร 3 กลุ่มคือ 1) กลุ่มผู้อพยพชาวกัมพูชาที่เขาอีด่างที่มาจากพนมเปญ 2) ชาวกัมพูชาที่อยู่ในกรุงวอชิงตันดี.ซี. และ 3) ชาวไทย ลาว และชาวเขมรที่อยู่ในประเทศกัมพูชา พบว่าชาวเขมรมี haplotype เป็นแบบ - + - + + + - β^E - + โดยมี FW เป็นแบบ FW3(Asian) ซึ่ง FW ชนิดนี้จะพบได้ในชาวเขมรเท่านั้น แต่ในชาวลาวและชาวไทยมี haplotype แบบ - + - + + + + β^E + - และ + - - - - + + β^E + - ตามลำดับ ซึ่งเป็น FW2 แสดงให้เห็นว่า ในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ β^E-globin gene มีหลายต้นกำเนิด เนื่องจากยีน β^E-globin gene พบทั้งแบบที่เป็น FW2 และ FW3 (Asian) แสดงว่าน่าจะเกิดจาก 1) recurrent mutation 2) double crossing over และ 3) two single crossing over

Hundrieser และคณะ (1988b) ได้ศึกษา DNA haplotype ของยีนบีตาอี ในประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 3 กลุ่ม ได้แก่ ประชากรภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของไทย รวมทั้งชาวเขมรในศูนย์ผู้อพยพชายแดนไทยกัมพูชา พบว่าในประชากรภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของไทย พบ β-globin gene frameworks ชนิดที่เป็น FW2 ซึ่งมี 5' haplotype เป็น - + - + + และชาวเขมรในประเทศกัมพูชา พบ β-globin gene frameworks ชนิดที่เป็น FW3 (Asian) ซึ่งมี 5' haplotype เป็น - + - + + ในการศึกษาครั้งนี้จะพบเฉพาะ FW 2 และ FW3 (Asian) เท่านั้น

Kazazian, และคณะ (1984) ได้ศึกษาผู้ที่มีฮีโมโกลบินอีชนิดเฮเทอโรไซโกต (HbEA) 2 ราย พบลักษณะแฮปโพลไทป์เป็น + - - - - β^E + + ซึ่งเป็น FW 1 ที่ยังไม่เคยพบมาก่อนหน้านี้ อีกหนึ่งโครโมโซมมีลักษณะแฮปโพลไทป์เป็น - + + - + β^E + - โดยที่ 5' haplotype ชนิดนี้ยังไม่เคยพบมาก่อน แต่ต่อมาพบลักษณะแฮปโพลไทป์นี้ในชาวอิสลาม และประเทศอินเดีย แสดงว่าน่าจะมีการเคลื่อนย้ายยีน (gene flow) มาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Yongvanit และคณะ (1989) ได้ศึกษาลักษณะแฮปโพไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินของประชากรชาวโส้ 118 คน ในอำเภอกุสุมาลย์ จังหวัดสกลนครชาวโส้มีภาษาพูดตระกูลมอญ–เขมร มีความสัมพันธ์กับชาวเขมรในประเทศกัมพูชาในระดับหนึ่ง แต่ใกล้ชิดกับเขมรเก่า (Karuic) และส่วยมากกว่า พบว่ามีความถี่ยีนฮีโมโกลบินอี 0.5 และพบ FW 2 เป็นส่วนใหญ่มี β^E -globin gene haplotype 2 แบบ คือ - + - + + β^E + - และ + - - - - β^E + - และพบ 5' haplotype แบบ + - - - - ซึ่งสามารถพบได้บ่อยในภาคอีสาน

Fucharoen และคณะ (1990) ได้ศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของผู้ที่เป็น HbE/β-thalassemia ในผู้ป่วยและญาติผู้ป่วยในจังหวัดขอนแก่นและจังหวัดใกล้เคียงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยศึกษา polymorphic restriction sites 7 ตำแหน่ง พบลักษณะแฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - - + - แสดงให้เห็นว่า β^E-globin gene เป็นชนิด FW 2 เป็นส่วนใหญ่

Fucharoen และคณะ (1997) ได้ศึกษาแฮปโพลไทป์กลุ่มยีนบีตาโกลบินในชนกลุ่มน้อยในประเทศไทยโดยใช้ เทคนิค PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้ได้ลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอี เป็นแบบ (- + - + + + -) และ (+ - - - - - +) มี FW เป็นชนิด FW2 ยกเว้นชาวซองพบแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอี เป็นแบบ (- + - + + - +) มี FW เป็นชนิด FW3(Asian) ซึ่งพบทั่วไปในประเทศกัมพูชา ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงการกระจายของแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอี และ FW ในชนเผ่าต่างๆในประเทศไทย

haplotype	Frameworks (FW)	North	North east	Hill tribes	Phu Tai	Chong	Sakai	Lao Song
(+ - - - - + -)*	2	1	2	2	5	1	3	2
(- + - + + + -)*	2	2	8	-	13	7	-	2
(+ - - - - - +)	3	-	-	-	1	6	-	-
(- + - + + - +)**	3	-	3	-	-	38	-	-
(- + - - - - +)	3	-	-	-	-	7	-	-
total chromosomes	3	3	13	2	19	59	3	4

หมายเหตุ * และ ** เป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ที่พบได้เสมอในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประชากรชาวเขมร ตามลำดับ

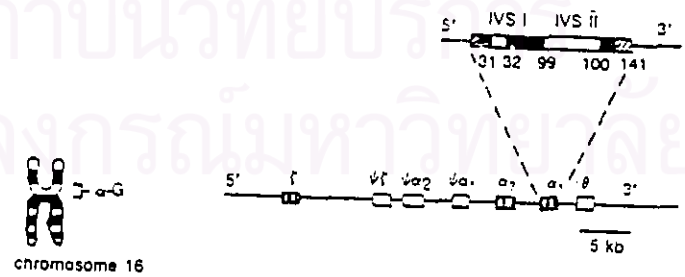
ที่มา : (Fucharoen และคณะ, 1997)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin gene cluster)

กลุ่มยีนแอลฟาโกลบินอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 แขนสั้น (16p13.3) ประกอบด้วยยีน 7 ยีน มีเนื้อที่ดีเอ็นเอมากกว่า 30 kb ประกอบด้วย 5' ζ_2 - $\psi\zeta_1$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ -3' ดังรูปที่ 2.9 มีเพียง 3 ยีน ที่ทำหน้าที่ คือ embryonic globin gene (ζ) alpha globin gene (α_2) และ alpha globin gene (α_1) ส่วนยีน psudogene มี 3 ยีน ($\psi\zeta_1$ $\psi\alpha_2$ $\psi\alpha_1$) ไม่ทำหน้าที่ ในการสังเคราะห์สายโกลบิน สำหรับ theta globin gene (θ) ยังไม่ทราบหน้าที่ (Breunig และคณะ, 1987) ยีนแอลฟาโกลบินถูกค้นพบ โดยอาศัยรูปแบบของ cDNA โดยใช้วิธี DNA hybridization ระหว่างเซลล์ร่างกายของมนุษย์กับหนู (Deisseroth และคณะ, 1977)

ยีน α_2 และยีน α_1 มีตำแหน่งอยู่ใกล้กันบนกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินมีเนื้อที่ดีเอ็นเอประมาณ 3.7 kb และพบว่ายีน α_2 และ α_1 มีลำดับเบส ที่เหมือนกันมาก (homology sequence) จากการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล พบว่ายีนแอลฟาโกลบินทั้งสองสามารถสังเคราะห์โกลบินโปรตีนเหมือนกัน (Bunn, Forget และ Ranney , 1977; Liebhaber และ Kan, 1981) ต่อมาได้ศึกษาระดับของ α-mRNA พบว่า α_2-globin mRNA มีมากกว่า α_1-globin mRNA ถึง 2.8 เท่า แสดงให้เห็นว่ายีน α_2 สามารถสังเคราะห์สายแอลฟาโกลบินในปริมาณที่มากกว่ายีน α_1 เมื่อเกิดมิวเตชันที่ยีน α_2 พบว่าอาการแอลฟาธาลัสซีเมียจะปรากฏรุนแรงกว่าเกิดมิวเตชันที่ยีน α_1



รูปที่ 2.9 แสดงกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin gene cluster)

รูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin deletion type)

การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินส่งผลให้เกิดแอลฟาธาลัสซีเมีย (α-thlassemia) แอลฟาธาลัสซีเมีย เป็นโรคพันธุกรรมที่มีความผิดปรกติ ในลักษณะปริมาณการสร้างสายแอลฟาโกลบิน แอลฟาธาลัสซีเมีย แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

α^0-thalassemia เกิดจากยีนแอลฟาโกลบินไม่สามารถสร้างสายแอลฟาโกลบินเลย เนื่องจากโครโมโซมข้างหนึ่งไม่มียีนแอลฟาโกลบิน ทั้งยีน α_2 และยีน α_1 (-- /αα)

α^+-thalassemia หมายถึง เกิดจากยีนแอลฟาโกลบินที่ยังมีการสร้างสายแอลฟาโกลบินอยู่บ้าง เนื่องจากโครโมโซมข้างหนึ่งยังมียีนแอลฟาโกลบินอยู่หนึ่งยีน (-α / αα)

รูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ Southeast Asian Type (--SEA) หรือ α^0-thalassemia

Southeast Asian Type (--SEA) จัดเป็น α^0-thalassemia ชนิดหนึ่งพบมากในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งในชาวจีน (Winichagoon และคณะ, 1984) พบว่ามีการขาดหายไปของดีเอ็นเอประมาณ 20 kb ของกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน โดยที่ยังมียีน embryonic globin gene (ζ) และ psudogene (ψζ) เหลืออยู่ การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบนี้ เป็นผลจาก illegitimate หรือปรากฏการณ์ nonhomologous recombination (Nicholls, Fischel และ Higgs.1987) หรืออาจเกิด recombination ระหว่าง *Alu* Family repeats (*Alu* Family repeates คือ กลุ่มยีนที่มีลำดับเบสซ้ำๆกัน ที่จำเพาะต่อการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I) สองกลุ่ม โดยที่ *Alu* Family repeats จะพบได้ประมาณ 3×10^5 ซ้ำ ในหนึ่งจีโนม โดยเฉพาะรอบๆ กลุ่มยีนแอลฟาโกลบินจะพบ *Alu* Family repeats จำนวนมาก เชื่อว่าน่าจะทำให้มีการสลับที่ดีเอ็นเอ แต่ปรากฏการณ์ recombination ของ *Alu* Family repeates ยังไม่สามารถที่จะอธิบายได้อย่างชัดเจน ในกรณีที่รูปแบบการขาดหายไปของยีนแบบ (-- SEA) เป็นโฮโมโซโกตจะทำให้เกิด Hb Bart's hydrops fetalis (--SEA/--SEA) ทำให้เสียชีวิตระหว่างอยู่ในครรภ์มารดา หรือตายหลังจากการคลอดได้ไม่นาน เนื่องจากไม่มีการสร้างสายแอลฟาโกลบิน เมื่อยีน --SEA เกิดร่วมกับ α^+-thalassemia หรือ HbCS จะทำให้เกิด HbH disease ส่งผลให้แสดงอาการแอลฟาธาลัสซีเมียออกมาซึ่งจะทำให้มีการลดลงของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย ในขณะเดียวกันเชื่อได้ว่าα^0-thalassemia แบบเฮทเตอโรไซโกต น่าจะมี selective advantage ต่อเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ทำให้ α^0-thalassemia ยังคงมีอยู่ใน

ประชากร แม้จะมีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย ทำให้ความถี่ของความผิดปรกติมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่สมดุลภายใต้การคัดเลือก

Ifediba และคณะ (1985) ได้ศึกษา α^0-thalassemia ใน in vitro พบว่าการมี selective advantage ต่อเชื้อมาลาเรียบ้าง แต่ยังไม่มีความชัดเจน แต่พบว่าในคนที่เป็น HbH disease เชื้อมาเลเรียเจริญได้ช้ามากในเซลล์เม็ดเลือดแดง การมีความถี่ของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียสูง เชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับการระบาดของมาเลเรีย มีความเป็นไปได้เนื่องจากพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมีความต้านทานต่อเชื้อมาเลเรีย

HbH diesease (--/-α) จะพบได้น้อยมากในประชากร เป็นปรากฏการณ์ที่อธิบายได้ว่าขณะที่ α^+-thalassemia มีปฏิสัมพันธ์กับ α^+-thalassemia ทำให้ α-globin gene เหลืออยู่ 2 ยีน (-α/-α) ซึ่งจะไม่ปรากฏอาการของธาลัสซีเมีย ฉะนั้นจึงทำให้ α^+-thalassemia ยังคงมีความถี่สูงในประชากร ในขณะเดียวกัน ถ้า α^0-thalassemia มีปฏิสัมพันธ์กับ α^0-thalassemia ทำให้ α-globin gene ไม่เหลืออยู่ (--/--) ทำให้ประชากรเสียชีวิต α^0-thalassemia จึงมีความถี่ลดลง โอกาสที่ α^+-thalassemia จะเกิดมีปฏิสัมพันธ์กับ α^0-thalassemia ก็ลดลงตามไปด้วย (Orkin และคณะ, 1979) ในประเทศอียิปต์ยีน α^+-thalassemia จะถูกพบในปริมาณสูง ในขณะเดียวกันไม่พบ α^0-thalassemia เลยจากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา (Novelletto และคณะ, 1989)

Lau และคณะ (1997) ได้ศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย ในชาวฮ่องกง โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง 2,420 ราย พบรูปแบบการขาดหายไปของยีนเป็นแบบ (--SEA) 4.5 เปอร์เซ็นต์

Jin Ai, Sin Hock, และ Nilmahi (1995) ได้ศึกษาการขาดหายไปของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียในชาวตาวินเนี่ยน อินเดี่ยนในสิงค์โปร์ โดยศึกษาการขาดหายไปแบบ (--SEA) ด้วยวิธี PCR จากกลุ่มตัวอย่าง 119 ราย พบเพียง 1 ราย

ในประเทศไทยโดยเฉพาะภาคเหนือ มีความถี่ยีน α-thalassemia สูงที่สุดในโลก Lemmens - Zygulska และคณะ (1996) ได้ศึกษาการกระจายยีนแอลฟาธาลัสซีเมียในภาคเหนือของประเทศไทย จากกลุ่มตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่ 215 ราย พบรูปแบบการขาดหายไปแบบ (- -SEA) จำนวน 30 ราย โดยทั่วไปในภาคเหนือพบการขาดหายไปแบบ (--SEA) สูงถึง

5-12 เปอร์เซ็นต์ (Hundrieser และคณะ, 1988c) นอกจากนี้ในกรุงเทพมหานครพบประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ (Tanphaichite และ Pungamarit 1988) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบเพียง 3.5 เปอร์เซ็นต์ (ถวัลย์วงศ์ รัตนสิริ และคณะ, 2539) และในภาคใต้ของประเทศไทยพบ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (Laosombat และคณะ, 1971) ตามลำดับ

อุรสรี สุขะสุนานนท์ (ยังไม่ตีพิมพ์) ได้ศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแบบ (--SEA) ในชาวไทยพวนจังหวัดลพบุรี เลย และจังหวัดอุดรธานี พบความถี่ยีนเป็น 0.040 0.098 และ 0.033 ตามลำดับ ในกลุ่มลาวโซ่งในจังหวัดสุพรรณบุรี พบรูปแบบการขาดหายไปแบบ (--SEA) 3.4 เปอร์เซ็นต์ จากกลุ่มตัวอย่าง 59 ราย (เกษม อายุการ, กุลนภา ฟู่เจริญ และสุพรรณ ฟู่เจริญ, 2539)

รูปแบบการขาดหายไปแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และแบบ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) หรือ α^{+}-thalassemia

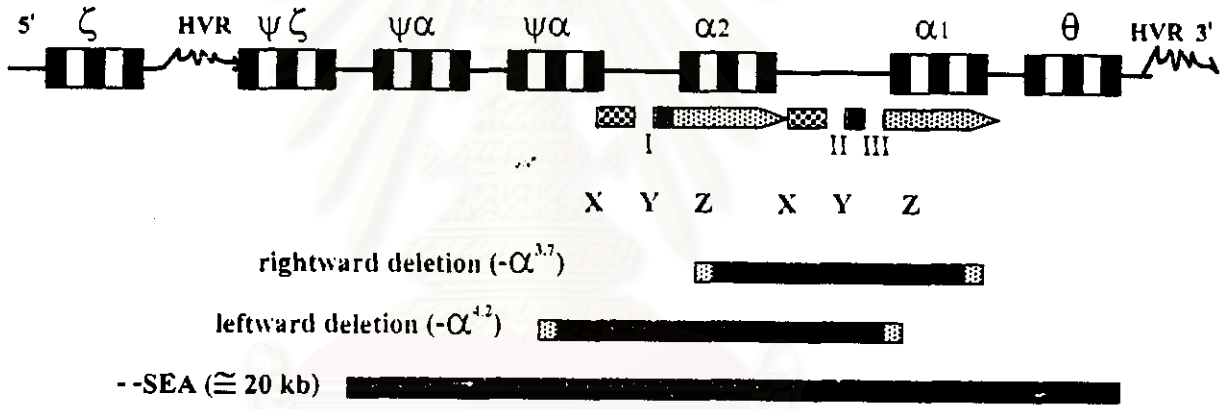
ในประชากรที่ต่างกันสามารถจะพบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินต่างกัน รวมถึงความถี่ของยีนก็ต่างกัน (Antonarakis และคณะ, 1985) ยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย พบได้บ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบทั้ง α^{0}-thalassemia และ α^{+}-thalassemia ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายได้ว่า ทำไมถึงพบยีนแอลฟาธาลัสซีเมียได้มากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Okin และคณะ, 1979) นอกจากนั้นยังสามารถพบได้ในแอฟริกา และเมดิเตอเรเนียน (Pirastu และคณะ, 1982)

α^{+}-thalassemia แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) การเกิดรูปแบบการขาดหายไปชนิดนี้ไม่ได้เกิดจาก selection แต่เกิดจากโครงสร้างของ α-globin gene ที่มีลำดับเบสเหมือนกัน (homology sequence) อยู่ 3 แห่ง คือส่วนของ x box y box และ z box โดยมี nonhomologous elements I II และ III ขั้นอยู่ ดังรูปที่ 2.12 (Lauer และคณะ, 1980) การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินหนึ่งยีน เป็นผลมาจากเกิด unequal crossing over ภายในบริเวณ z box ที่มีพื้นที่ขนาด 2.1 kb หรือ x box มีพื้นที่ขนาด 0.4 kb จะเกิดขึ้นระหว่างโครโมโซม หรือภายในโครโมโซม (Stephen และ Judy, 1980)

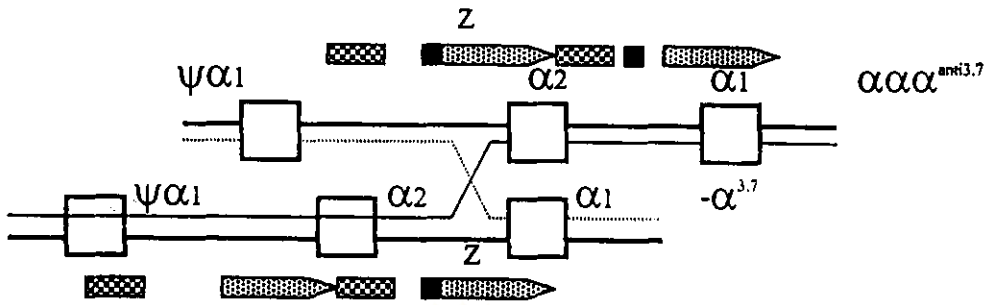
Rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) เกิดจากการขาดหายไปของยีน α_2-globin gene และ α_1-globin gene โดยขาดหายไป 3.7 kb เกิดจาก unequal crossing over ในบริเวณ z box มีการขาดหายไปของยีน α_2-globin gene ทางด้านปลาย 3' ยีนส่วนที่เหลือจะรวมกัน โดยจะประกอบด้วย

ด้าน 5' ของยีน α_2 globin gene และด้าน 3' ของยีน α_1 globin gene ทำให้ได้ยีนตัวใหม่ ที่มีส่วนของทั้งสองยีนรวมกัน เกิดเป็นยีนลูกผสม (hybrid gene) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดยีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีน triplicated alpha globin gene ($\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$) (Goossens และคณะ, 1980) ดังรูปที่ 2.13

Rightward deletion สามารถแบ่งชนิดย่อย ออกเป็น $-\alpha^{3.7}$ subtype I $-\alpha^{3.7}$ subtype II และ $-\alpha^{3.7}$ subtype III แบ่งตามตำแหน่งของการ crossing over ภายในส่วนของ z box type I พบได้มากในเมดิเตอเรเนี่ยน type II พบได้บ้างในบางกลุ่มประชากร และ type III พบเฉพาะในชาวเมลานีเซียน และโพลีนีเซียน (Higgs และคณะ, 1984; Hill และคณะ, 1985)

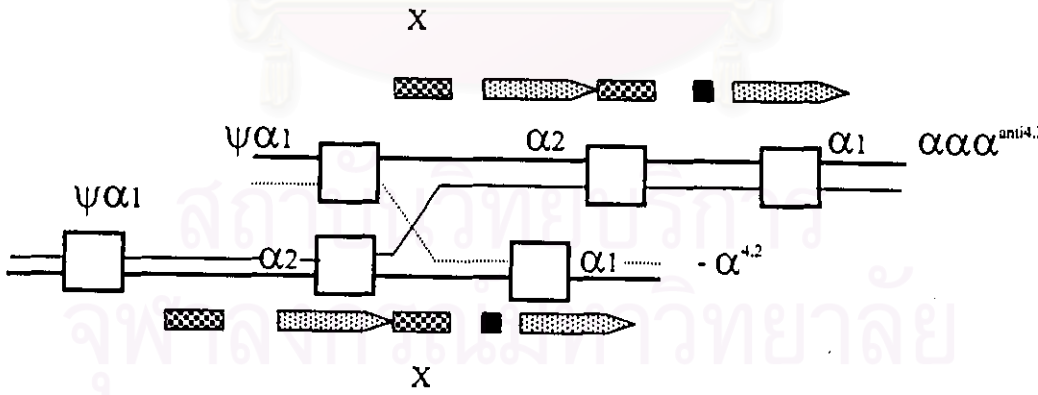


รูปที่ 2.10 แสดงการเรียงลำดับของยีนในกลุ่มแอลฟาโกลบินและขนาดของยีนที่ขาดหายไปแบบ rightward deletion และ leftward deletion และ Southeast Asian Type (--SEA) ตามลำดับ x y และ z box คือ homology sequence ที่พบในบริเวณของ α2 และ α1 I II และ III คือ nonhomology sequence ที่ขั้นระหว่าง x y และ z box



รูปที่ 2.11 แสดงการเกิด unequal crossing over ในบริเวณ z - box ส่งผลให้ยีนขาดหายไป 3.7 kb ทำให้ได้โครโมโซมแท่งหนึ่งที่มียีนแอลฟาถูกผสมหนึ่งยีน (hybrid gene) และโครโมโซมอีกแท่งหนึ่งมียีนเพิ่มขึ้นหนึ่งยีนเกิดเป็น triplicated alpha globin gene ($\alpha\alpha\alpha^{anti3.7}$)

leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) เกิดจากการขาดหายไปของดีเอ็นเอบริเวณ α_2-globin gene ขาดหายไปโดยมีความยาวประมาณ 4.2 kb ยังคงเหลือยีน α_1-globin gene เท่านั้น ที่ยังสร้างสายแอลฟาโกลบิน เกิดจาก unequal crossing over ในบริเวณ x box เป็นผลให้ดีเอ็นเอขาดหายไป 4.2 kb นอกจากนี้ยังทำให้ได้ยีนแอลฟาโกลบิน 3 ยีน ($\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$) ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.12 แสดงการเกิด unequal crossing over ในบริเวณ x - box ส่งผลให้ยีนขาดหายไป 4.2 kb ทำให้ได้โครโมโซมแท่งหนึ่งเหลือยีนแอลฟาหนึ่งยีนและโครโมโซมอีกแท่งหนึ่งมียีนเพิ่มขึ้นหนึ่งยีนเกิดเป็น triplicated alpha globin gene ($\alpha\alpha\alpha^{anti4.2}$)

rightward deletion และ leftwrard deletion พบว่ามีการกระจายอย่างสูงในเขตร้อน (tropical) และเขตก่อนข้างร้อน (subtropical) รวมทั้งในแอฟริกา ชาวนิโกร เมดิเตอเรเนี่ยน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และบางเกาะในแปซิฟิก โดยส่วนใหญ่จะเป็นแบบ rightgward deletion แต่พบว่าในประชากรปาปัวนิวกีนีพบ leftward deletion สูงมากกว่า 80% (Oppenheimer และคณะ, 1984) ในประเทศออสเตเลีย สามารถพบ α^+-thalassemia ได้ โดยพบแบบ rigthward deletion ($-\alpha^{3.7}$) มากกว่า leftward deletion การมียีน α-thalassemia เกิดขึ้นสูง เชื่อว่าเป็นผลมาจาก 1) isolation 2) intense inbreeding 3) natural selection (Pembrey และคณะ, 1975) การที่มีความถี่ของยีน α^+-thalassemia สูง ยังไม่สามารถหาเหตุผลอธิบายได้ โดยเฉพาะ ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) พบได้โดยทั่วไปในโลกแต่ ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) พบได้เพียงบางพื้นที่ ซึ่งเชื่อว่าอาจเกิดจากกลไกของการเกิด crossing over หรืออาจเป็นเพราะบริเวณ homology sequence ที่เกิด crossing over ของ leftward deletion เป็นบริเวณที่แคบประมาณ 0.4 kb เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่เกิด crossing over ของ rightward deletion ที่มีบริเวณที่กว้างกว่า คือ ประมาณ 2.1 kb (Trent และคณะ, 1981) หรืออาจเป็นไปได้ว่า ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) มี selective advantage มากกว่า ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) (Okin และ Goff, 1981)

การที่ไม่ทราบระดับความรุนแรงของการระบาดของเชื้อมาลาเรีย จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ไม่สามารถอธิบายปรากฏการณ์ที่พบความถี่แอลฟาธาลัสซีเมียสูง เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อย จึงไม่ทราบว่าความถี่สูงของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย เกิดขึ้นได้อย่างไร (Higgs และคณะ, 1986)

Novelletto และคณะ (1989) ได้ศึกษาความถี่และชนิดการขาดหายไปของยีน α-thalassemia ในประเทศอียิปต์ พบความถี่ของการขาดหายไปของยีน α^--thalassemia 0.08 โดยพบแบบ $-\alpha^{3.7}$type I มากกว่าแบบ $-\alpha^{4.2}$

Yenchitsomanus และคณะ (1985) ได้ศึกษาความถี่ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน ในชาวแมร์แดง (Madang) ที่อยู่ในจังหวัดทางตอนเหนือของปาปัวนิวกินี และประชากรที่บนเกาะคาร์ คาร์ ทำการศึกษาโดยวิธี Southern blot พบว่าชาวมาร์แดงมีการขาดหายไป แบบ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) 95.9 เปอร์เซ็นต์ และแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) พบเพียง 4.1 เปอร์เซ็นต์ ประชากรในเกาะคาร์ คาร์ (Kar Kar) leftward deletion พบ 95.6 เปอร์เซ็นต์ และแบบ rightward deletion พบ 4.4 เปอร์เซ็นต์

ในประเทศไทยพบว่ามีความถี่ยีน α-thalassemia แตกต่างกัน ในกรุงเทพมหานครพบ 16.25 เปอร์เซ็นต์ (Tanphaichitc และคณะ, 1988) ในภาคเหนือพบสูงถึง 26.4 เปอร์เซ็นต์ (Hundrieser และคณะ, 1988) ในภาคใต้พบความถี่ต่ำมาก

Lemmens-Zygulska และคณะ (1996) ได้ศึกษาการกระจายแอลฟาธาลัสซีเมีย ในจังหวัดเชียงใหม่ พบรูปแบบการขาดหายไปแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) 36 ราย ที่มีจีโนไทป์แบบ ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$) และ 3 ราย ที่มีจีโนไทป์แบบ ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) จาก 215 ราย

อุรศรี สุขะศุนานนท์ (ยังไม่ตีพิมพ์) ได้ศึกษาความถี่รูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในไทยพวนจังหวัดลพบุรี เลย และอุดรธานี พบรูปแบบการขาดหายไปแบบ rightward deletion พบความถี่ 0.024 0.015 และ 0.090 ตามลำดับ แบบ leftward deletion มีความถี่ 0.006 0.008 และอุดรธานี ไม่พบการขาดหายไปแบบ leftward deletion

วิธี Southern blot

ตั้งแต่ปี (1970) Smith และคณะ ได้ศึกษาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ได้จาก *Haemophilus influenzae* ซึ่งมีคุณสมบัติที่ทำให้สาย DNA แยกออกจากกัน เอนไซม์ตัดจำเพาะตัวนี้ และเอนไซม์ตัดจำเพาะตัวอื่นที่มีคุณสมบัติคล้ายกัน ถูกนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้าง DNA ซึ่งเป็นการศึกษาระยะเริ่มต้น ก่อนที่จะมีการศึกษา Southern blot (Southern, 1975)

Southern blot เป็นวิธีการที่ต้องอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อที่จะให้ได้ท่อนดีเอ็นเอ (DNA fragments) จำนวนมาก และตรวจหาว่ายีนหรือดีเอ็นเอที่เราสนใจอยู่ ว่าอยู่ในดีเอ็นเอท่อนใด ในกรณีที่เกิด deletion insertion และ rearrangement ที่มีขนาดใหญ่จะต้องอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดจีโนมิคดีเอ็นเอ หลังจากนั้นทำการแยกท่อนดีเอ็นเอออกจากกัน ทำโดยเทคนิค Southern blot (Southern, 1975) ซึ่งแยกท่อนดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปในตัวกลางที่เป็นวุ้น (agarose gel electrophoresis) ท่อนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะวิ่งในสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่า ท่อนดีเอ็นเอขนาดเล็ก สามารถทราบตำแหน่งท่อนดีเอ็นเอนั้นได้ โดยนำไปเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นมาตราฐาน หลังจากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแยกออกเป็นสายเดี่ยว เพื่อที่จะให้ probe ไปจับกับท่อนดีเอ็นเอที่มียีนที่เราต้องการอยู่แล้ว จากนั้นย้ายท่อนดีเอ็นเอที่แยกได้ ถ่ายลงในแผ่น cellulose membrane หรือแผ่น nylon membrane ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า "blotting" จากนั้นนำ probe ที่เตรียมไว้ที่ติดฉลากด้วยสาร

nylon membrane ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า "blotting" จากนั้นนำ probe ที่เตรียมไว้ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารเคมีที่ทำให้เกิดแถบสี จากนั้นนำไปจับกับท่อนดีเอ็นเอที่ถ่ายลงในแผ่น cellulose membrane หรือ nylon membrane ขั้นตอนนี้ เรียกว่า " hybridization" ตรงตำแหน่งที่มีการ hybridization ก็จะเกิดกัมมันตรังสีทำปฏิกิริยากับฟิล์มเอ็กซเรย์ปรากฏเป็นแถบดำ หรือแถบสีขึ้น เมื่อเทียบกับขนาดท่อนดีเอ็นเอที่ตรวจพบในคนปรกติ ก็จะสามารถบอกได้ว่ามี deletion insertion และ rearrangement หรือไม่

Huang และคณะ (1988) ได้ศึกษาจีโนไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมีย ในประเทศจีน โดยวิธี Southern blot ดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ B*am*HI ได้ดีเอ็นเอขนาด 10 kb สำหรับที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน 1 ยีน ในคนปรกติจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 14 kb เมื่อตัด B*gl* II ในคนผิดปรกติจะได้ดีเอ็นเอขนาด 7.2 kb ในคนปรกติที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 12.3 kb และ 7.2 kb ตามลำดับ แยกขนาดดีเอ็นเอในความเข้มข้นอะกาโรส 0.8% จากนั้นถ่ายดีเอ็นเอลงในไนโตเซลลูโลส ติดตามด้วยดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วย ^{32}P labeled α- globin gene probe พบว่าในกวางตอง (Guangdong) กวางสี (Guagxi) และเฉฉวน (Sichuch) มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาแบบ rigthward deletion ($-\alpha^{3.7}$) ทุกเมือง โดยมีมากกว่าแบบ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$)

Sanchisuriya และคณะ (1997) ได้ศึกษายีโมโกลบินผิดปรกติ HbE เฮทเทอโรไซโกต ร่วมกับการตรวจสอบยีน α^+ -thalassemia โดยวิธี Southern blot ใช้ B*am*HI และ B*gl* II ในการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอ ติดตามด้วย α/*Pst*I ใน pUC 9 α-globin gene probe ติดฉลากด้วย nonradioactive ติดตามดีเอ็นเอ และตรวจสอบผลโดยใช้ digoxigenin hybridized signal ตามวิธี Boeringer Mannheim, Germany