การศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินและรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในชนกลุ่มชาวน้ำ จังหวัดภูเก็ต

นางสาวนันทวรรณ ชื่นชมคุณาธร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-182-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY OF BETA – GLOBIN GENE CLUSTER HAPLOTYPES AND GENE DELETION TYPE OF ALPHA – GLOBIN GENE IN CHAONAM POPULATION IN PHUKET PROVINCE

Miss Nuntawan Chuenchomkunatorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-333-182-4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินและรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในชนกลุ่มชาวน้ำจังหวัดภูเก็ต
โดย	นางสาวนันทวรรณ ชื่นชมคุณาธร
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์พรรณี ชิโนรักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณ ฟู่เจริญ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์พรรณี ชิโนรักษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณ ฟู่เจริญ)

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์

นันทวรรณ ชื่นชมคุณาธร : การศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินและรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในชนกลุ่มชาวน้ำ จังหวัดภูเก็ต (STUDY OF BETA – GLOBIN GENE CLUSTER HAPLOTYPES AND GENE DELETION TYPE OF ALPHA – GLOBIN GENE IN CHAONAM POPULATION IN PHUKET PROVINCE)
อ. ที่ปรึกษา : รศ. พรรณี ชิโนรักษ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. สุพรรณ ฟู่เจริญ,
115 หน้า. ISBN 974-333-182-4.

การศึกษาชนิดของฮีโมโกลบิน ด้วยวิธีเซลลูโลสอะซิเตทอิเลคโตรโฟเรซีส ของประชากรชาวน้ำ 2 กลุ่มคือชาวน้ำที่อาศัยอยู่บริเวณท่าฉัตรไชย ต.ไม้ขาว อ. ถลาง จ. ภูเก็ต จำนวน 64 ราย และชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ ต. รัษฎา อ. เมือง จ. ภูเก็ต จำนวน 65 ราย ตรวจพบฮีโมโกลบินอีชนิดเฮทเตอโรไซโกต 4 รายและ 7 ราย คิดเป็น 6.25 % และ 10.76 % ตามลำดับ ความถี่ยีนบีตาอีโกลบิน f (β^E) เท่ากับ 0.031 และ 0.054 ตามลำดับ ในประชากรชาวน้ำพบความถี่ยีนบีตาอีรวม f (β^E) เท่ากับ 0.043

เมื่อศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตาอีโกลบินโดยวิธีพีซีอาร์และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ส่วนมากพบยีนบีตาอีอยู่บนโครโมโซมชนิด FW 2 มีแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอี 2 แบบเป็นแบบ + - - - - β^E + - หรือแบบ - + - - + + β^E + - เป็นส่วนใหญ่โดยพบว่ายีนบีตาอีที่พบมี chromosome background เหมือนในคนไทย คนลาว ลาวโซ่ง ภูไท ชาวโส้ และชาวกูย แสดงให้เห็นว่าชาวน้ำมียีนบีตาอีโกลบินที่มีต้นกำเนิดเดียวกัน และพบชนิด FW 3 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ - + - - + + β^E - + ซึ่งเป็นแฮปโพลไทป์ที่พบได้บ่อยในชาวเขมร แสดงว่ามีการแต่งงานข้ามกลุ่ม ระหว่างประชากรชาวน้ำกับคนที่มีเชื้อสายชาวเขมรและศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน พบยีนบีตาเออยู่บนโครโมโซมชนิด FW 2 มีแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอเป็นแบบ + - - - - β^A + - และชนิด FW 3 เป็นแบบ + - - - - β^A + - และ - + + - + β^A - + ซึ่งเป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ที่พบได้มากและสามารถพบได้ในชนเผ่าต่างๆที่อยู่ในประเทศไทย

จากการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน ในประชากรชาวน้ำพบเพียงชนิด rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) เท่านั้น ซึ่งตรวจพบได้ด้วยวิธี Southern blot hybridization มีความถี่อัลลีลเป็น 0.089

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

3972831723 : MAJOR GENETICS
KEY WORD: BETA – E GLOBIN GENE / BETA – A GLOBIN GENE / ALPHA GLOBIN GENE / GENE DELETION TYPE.
NUNTAWAN CHUENCHOMKUNATORN : STUDY OF BETA – GLOBIN GENE CLUSTER HAPLOTYPES AND GENE DELETION TYPE OF ALPHA – GLOBIN GENE IN CHAONAM POPULATION IN PHUKET PROVINCE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PANNEE CHINORAK. THSIS CO – ADVISOR : ASSIST. PROF. SUPAN FUCHAROEN, Ph.D. 115 pp.
ISBN 974-333-182-4.

Hemoglobin typing using cellulose acetate electrophoresis in 2 Chaonam populations ; 64 and 65 individuals inhabited in Tachatchai Tambol Maikaw Amphur Talang Phuket Province and Kaosirei Tambol Ratsada Ampher Muang Phuket Province were carried out . It was found that the incidences of Hb E heterozygotes are 6.25 % and 10.76 % , respectively and β^E globin gene frequencies f (β^E) are 0.031 and 0.054 ,respectively.

β^E globin gene associated with haplotypes were determined using PCR following by restriction endonuclease analysis. The most common haplotype are + - - - - β^E + - or - + - - + + β^E + - which associated with FW 2 similar to the previous studies in Thais, Phutai, Chong, Laos Song and Kui population indicating the same origin of β^E globin gene. The other haplotype is - + - - + + β^E - + which associated with FW 3 that are found commonly among Cambodian. In β^A globin gene we found many haplotypes, one is + - - - - β^A + - which associated with FW 2, the other haplotypes are + - - - - β^A - + และ - + + - + β^A - + which associated with FW 3. These haplotypes and frameworks associated with β^A globin gene which was commonly found among ethnic groups of Thailand.

Deletion types and frequencies of α- globin gene were also examined in these Chaonam populations. Only one type of α- globin gene deletion , rightward deletion type ($-\alpha^{3.7}$) was found. Rightward deletion type ($-\alpha^{3.7}$) determined by Southern blot . The frequencies of rightward deletion in Chaonam populations are 0.089

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

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากหลายๆฝ่ายด้วยกันผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านดังมีรายนามต่อไปนี้

รองศาสตราจารย์ พรรณี ชิโนรักษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ ฟู่เจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำช่วยเหลือและส่งเสริมในการทำงานวิจัยมาโดยตลอด

รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสินผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องจนเป็นวิทยานิพนธ์ที่สมบูรณ์แบบมากยิ่งขึ้น

รองศาสตราจารย์ กุลนภา ฟู่เจริญ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กนกวรรณ แสนไชยสุริยา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ณัฐยา แซ่อึ้งที่ให้คำแนะนำขั้นตอนต่างๆในการทำวิจัย

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี ที่ใช้ในการทำงานวิจัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความสะดวกในเรื่องรถที่ไปทำการสำรวจและทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่จังหวัดภูเก็ต

บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยบางส่วน

คุณยุทธนา เพ็งแจ่ม ที่ช่วยดูแลเรื่องอุปกรณ์ สารเคมี และขั้นตอนต่างๆในการทำงานวิจัย

คุณอุรศรี สูยะศุนานนท์ คุณประยุกต์ ศรีวิไล นิสิตปริญญาโทสาขาพันธุศาสตร์และนิสิตปริญญาตรีปี 4 สาขาพันธุศาสตร์

ผู้ใหญ่บ้าน ต. รัษฎา และผู้ใหญ่บ้าน ต.ไม้ขาว จ. ภูเก็ต ที่ได้ให้ความสะดวกในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ชาวน้ำทุกคนที่ ต. รัษฎาและ ต. ไม้ขาว ที่ได้ให้เลือดมาเป็นตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

เจ้าหน้าที่สาธารณสุข ต. รัษฎา และ ต. ไม้ขาว ที่ได้ช่วยเหลือในการเจาะเลือดในครั้งนี้

คุณพ่อคุณแม่และน้อง ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในการเรียนให้สำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญรูปภาพ..... ญ
คำอธิบายคำย่อ..... ฏ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. ตรวจเอกสาร.....3
3. เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี.....37
4. วิธีดำเนินการศึกษา.....41
5. ผลการศึกษา.....64
6. อภิปรายผลการศึกษา.....90
7. สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....100
รายการอ้างอิง.....102
ภาคผนวก.....107
ประวัติผู้วิจัย.....115

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงค่าเปรียบเทียบจำนวนร้อยละของผู้ที่มี Hb E ที่สำรวจในประชากรแหล่งต่างๆ.....12

2.2 แสดงการกระจายลักษณะแฮปโพลไทป์และ framework ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน ในชนกลุ่มน้อยต่างๆในประเทศไทย.....23

2.3 แสดงการกระจายลักษณะแฮปโพลไทป์และ framework ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน ในชนกลุ่มน้อยต่างๆในประเทศไทย.....25

4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และตำแหน่งของยีนภายในกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตา–เอโกลบินและยีนบีตา–อีโกลบิน....50

4.2 แสดงเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและบัฟเฟอร์ที่ใช้..... 52

4.3 แสดงชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในปฏิกริยา PCR.....54

5.1 แสดงผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย.....65

5.2 แสดงผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่.....66

5.3 แสดงผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน.....66

5.4 แสดงผลการศึกษา β^E – globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตร ไชยและเกาะสิเหร่.....70

5.5 แสดงผลการศึกษา β^A – globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน....71

5.6 แสดงความถี่ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion ใน ประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย.....85

5.7 แสดงความถี่ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion ใน ประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่.....86

5.8 แสดงความถี่ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion ใน ประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน.....86

6.1 แสดงผลการศึกษา β^E – globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำเปรียบเทียบ กับชนกลุ่มอื่นที่มีรายงานไว้.....92

6.2 แสดงผลการศึกษา β^A – globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำเปรียบเทียบ กับชนกลุ่มน้อยต่างๆในประเทศไทย.....94

6.3 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวน้ำเปรียบเทียบ กับชนกลุ่มต่างๆในประเทศไทย.....96

ตารางที่ หน้า

6.4 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวน้ำเปรียบเทียบกับชนกลุ่มต่างๆในประเทศไทย.....97
6.5 เปรียบเทียบ % ของรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบต่างๆในชนเผ่าต่างๆกับชาวน้ำ..... 99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงรูปแผนที่จังหวัดภูเก็ตและบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง.....5

2.2 โครงสร้างจำลองของฮีโมโกลบิน.....6

2.3 แสดงชนิดของฮีโมโกลบินที่สร้างขึ้นในร่างกายมีความสัมพันธ์กับขั้นตอนการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะ embryo จนเป็น fetus และ adult.....7

2.4 รูปจำลองแบบของฮีโมโกลบิน A และ A2 ที่วิ่งในสนามไฟฟ้า.....8

2.5 แสดง Hb E ที่เกิดความผิดปกติที่กลุ่มยีนบีตาโกลบินบนโครโมโซมแท่งที่ 11.....10

2.6 แสดงชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis.....11

2.7 แสดงตำแหน่ง splicing ที่ผิดปกติในยีนบีตาอีโกลบิน.....11

2.8 แสดงหลักการเพิ่มปริมาณ DNA polymerase chain reaction (PCR).....16

2.9 แสดงกลุ่มยีนบีตาโกลบินบนโครโมโซมแท่งที่ 11.....17

2.10 แสดงภาพขยายยีนบีตาโกลบิน.....18

2.11 แสดงตำแหน่งของ DNA polymorphism ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินและจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆที่ปรากฏในแต่ละตำแหน่ง.....19

2.12 แสดงตำแหน่ง 5′ haplotype กับ 3′ haplotype หรือ framework และรูปแบบของ FW 1, FW 2, FW 3 และ FW 2/3 ที่ได้จากการตัดได้ (+) หรือไม่ได้ (-) ของ restriction enzyme ที่ตำแหน่งจุดตัดจำเพาะ.....20

2.13 ไดอะแกรมโครงสร้างของยีนบีตาโกลบินแสดงชนิด β – globin gene frameworks ที่แตกต่างกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์.....21

2.14 แสดงกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 16.....26

2.15 แสดงกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 16 รูปขยายแสดงตำแหน่งของ coding sequence และ non coding sequence.....27

2.16 แสดงตำแหน่ง homology sequence (X, Y, Z boxes).....28

2.17 แสดง α- thalassemia ชนิดต่างๆที่เกิดการขาดหายไปของ α-globin gene.....29

2.18 แสดงการเรียงลำดับของยีนในกลุ่มแอลฟาโกลบินและขนาดของยีนที่ขาดหายไปแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) , leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) ที่พบในคนไทย.....31

2.19 แสดงการเกิด unequal crossing over ในบริเวณ Z-box.....32

2.20 แสดงการเกิด unequal crossing over ในบริเวณ X-box.....32

4.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด.....42
4.2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ.....46
4.3 แผนภูมิแสดงขั้นตอนในการศึกษา DNA polymorphism หรือลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β – globin gene haplotypes) โดยวิธี PCR.....48
4.4 แสดงตำแหน่งของ DNA restriction polymorphism ภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน.....49
4.5 แผนภูมิแสดงขั้นตอนในการตรวจสอบ Southeat Asian type (- - SEA) หรือ α^0- thalassemia โดยวิธี PCR.....56
4.6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนในการตรวจสอบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) หรือ α^+- thalassemia ด้วยวิธี Southern blot hybridization.....58
5.1 แสดงผลการศึกษาใน A*va*II polymorphism ตำแหน่งที่ 6.....68
5.2 แสดงผลการศึกษาใน B*am*HI polymorphism ตำแหน่งที่ 7.....69
5.3 แสดงผลการศึกษาใน H*inc*II polymorphism ตำแหน่งที่ 1.....73
5.4 แสดงผลการศึกษาใน H*ind*III polymorphism ตำแหน่งที่ 2.....74
5.5 แสดงผลการศึกษาใน H*ind*III polymorphism ตำแหน่งที่ 3.....75
5.6 แสดงผลการศึกษาใน H*inc*II polymorphism ตำแหน่งที่ 4.....76
5.7 แสดงผลการศึกษาใน H*inc*II polymorphism ตำแหน่งที่ 5.....77
5.8 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีที่พบในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย.78
5.9 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีที่พบในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่.....79
5.10 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีที่พบในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน...80
5.11 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอที่พบในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย.....81
5.12 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอที่พบในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่.....82
5.13 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอที่พบในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน...83
5.14 แสดงตำแหน่ง B*am*HI บนแผนที่ยีน และการศึกษารูปแบบของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion และ leftward deletion.....87
5.15 แสดงตำแหน่ง B*gl*II บนแผนที่ยีน และการศึกษารูปแบบของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion และ leftward deletion.....89

คำอธิบายคำย่อ

ASPCR	Allele Specific Polymerase Chain Reaction
β^E	beta E globin gene
β^A	beta A globin gene
bp	base pairs
^0C	องศาเซลเซียส
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
Dnase	deoxynuclease
EDTA	ethyene diamine tetra acetate
FW	DNA frameworks
HCl	hydrochloric acid
Kb	kilobase
KCl	potassium chloride
M	molar
mM	millimolar
µl	microlitre
$MgCl_2$	magnesiumchloride
Mg	magnesium
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	picomol
Rnase	ribonuclease
Rpm	round per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
Taq	*Thermus aquaticus*
มล.	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มก. มิลลิกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ชาวน้ำ (ชาวทะเล) เป็นชนกลุ่มน้อยกลุ่มหนึ่งที่อาศัยอยู่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ตามประวัติศาสตร์ถือว่าชนกลุ่มนี้เป็นชนพื้นเมืองดั้งเดิมของชาติมลายูที่ยังเหลืออยู่โดยมิได้กลายเป็นพวกมลายู ภายหลังได้อพยพตั้งหลักแหล่งอยู่บริเวณจังหวัด ระนอง, พังงา, ภูเก็ต, กระบี่, สตูล และ ตรัง (ประเทือง เครือหงส์ , 2519)

เสมอชัย พูลสุวรรณ (2536) ได้จัดจำแนกชนกลุ่มต่างๆตามภาษาพื้นเมืองที่ใช้โดยจัดชาวน้ำให้อยู่ในกลุ่มภาษาตระกูลออสโตร-นีเซียน ซึ่งเป็นภาษาพูดที่ใช้อยู่ในหมู่เกาะบริเวณเอเชียอาคเนย์ เช่นกลุ่มมุสลิมจากภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งพูดภาษายาวี จากการศึกษาและค้นคว้า (อ้างถึงในสารานุกรมไทยฉบับราชบัณฑิตยสถาน, 2498 เล่มที่ 10 หน้า 6226) พบว่าชาวน้ำมีลักษณะคล้ายชาวมองโกล แต่ไม่เด่นนักสูงราวคนไทย ผิวกร้านดำ อุทัย หิรัญโต (2516) เมื่อพิจารณารูปร่างลักษณะและหน้าตาของชาวน้ำจะเห็นได้ชัดเจนว่าคล้ายคลึงกับชาวมลายูเป็นอย่างยิ่ง สันนิษฐานว่าชาวน้ำเป็นพวกเชื้อชาติมองโกล (Mongoloid) เช่นเดียวกับพวกอินเดียนแดง จีน พม่า ไทย มลายู อินโดนีเซีย และนิกริโต เป็นต้น

เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์และความใกล้ชิดกันในกลุ่มชาวน้ำ 2 กลุ่มในจังหวัดภูเก็ต จึงนำเอาความรู้ทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยศึกษาดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสม (DNA polymorphism) หรือดีเอ็นเอแฮปโพลไทป์ (DNA haplotypes)ในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene cluster) โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Saiki และคณะ, 1985) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ที่ตำแหน่งต่างๆ (polymorphic restriction sites) แล้วตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟเรซีส (gel electrophoresis) และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จากนั้นส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) นอกจากนี้ยังศึกษาหารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินทั้ง 3 ชนิดที่เป็นแบบแอลฟาศูนย์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเมื่อได้ชิ้นส่วนDNAที่เพิ่มจำนวนได้แล้วนำมาตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและรวดเร็วและได้ตรวจสอบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินชนิดแอลฟาบวกอีกโดยวิธี Southern blot hybridization ใช้

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะดีเอ็นเอจะถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ทำให้ได้ท่อนของดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบได้จากการทำ agarose gel electrophoresis จากนั้นย้ายไปไว้บน filter sheet และให้ hybridize กับดีเอ็นเอ probe ก็จะทำให้ทราบถึงรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบต่างๆได้

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในชนกลุ่มชาวน้ำที่อาศัยอยู่ที่บ้านท่าฉัตรไชย ต.ไม้ขาว อ. ถลาง จ. ภูเก็ต และเกาะสิเหร่ ต. รัษฎา อ. เมือง จ. ภูเก็ต โดยทำการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ซึ่งอาศัยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด และโพลีมอร์ฟิกเรสตริกชั่นไซท์ (polymorphic restriction sites) ในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน 7 ตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งที่ 1 5' ε-*Hin*cII ตำแหน่งที่ 2 $^{G}\gamma$-*Hin*dIII ตำแหน่งที่ 3 $^{A}\gamma$- *Hin*dIII ตำแหน่งที่ 4 $\psi\beta$ - *Hin*cII ตำแหน่งที่ 5 3' *Hin*cII ตำแหน่งที่ 6 β-A*va*II และ ตำแหน่งที่ 7 3'β-B*am* HI (Fukumaki และ Fucharoen, 1991)และทำการสำรวจชนิดของฮีโมโกลบินในกลุ่มชาวน้ำโดยใช้ cellulose acetate electrophoresis จากนั้นศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินโดยวิธีพีซีอาร์ และ Southern blot hybridization ด้วย α-probe ซึ่งในกลุ่มชาวน้ำทั้ง 2 กลุ่มนี้ยังไม่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน ลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินในชนกลุ่มชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชย ต. ไม้ขาว อ. ถลาง จ. ภูเก็ต และชาวน้ำบริเวณ เกาะสิเหร่ ต. รัษฎา อ. เมือง จ. ภูเก็ต ที่ศึกษาได้นำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มชาวน้ำ 2 กลุ่มและกับชนกลุ่มอื่นที่ได้เคยทำการศึกษาไว้แล้วเพื่อบอกถึงความสัมพันธ์และความใกล้ชิดกันในทางบรรพบุรุษ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินหาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินและบีตาเอโกลบินและศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในชนกลุ่มชาวน้ำที่อาศัยอยู่ที่บ้านท่าฉัตรไชย ต.ไม้ขาว อ. ถลาง จ. ภูเก็ต และเกาะสิเหร่ ต. รัษฎา อ. เมืองจ. ภูเก็ต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลความถี่ของยีนบีตาโกลบินอีในกลุ่มชาวน้ำ 2 กลุ่มในจังหวัดภูเก็ต ทำให้ทราบลักษณะแฮปโพลไทป์ ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินในกลุ่มชาวน้ำ 2 กลุ่มในจังหวัดภูเก็ตเพื่อเป็นการบอกถึงความสัมพันธ์และความใกล้ชิดกันในทางบรรพบุรุษและกับกลุ่มชาติพันธ์อื่นๆที่ได้มีการศึกษาเอาไว้แล้วและเพื่อให้ทราบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในกลุ่มชาวน้ำ 2 กลุ่มในจังหวัดภูเก็ต

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ชาวน้ำ (The Chaonam or Orang Laut or Sea Gypsies- Gypsies)

ชาวพื้นเมืองเรียกชาวน้ำว่า " ชาวทะเล " หรือ " ชาวเล " ตามสำเนียงพื้นเมืองของชาวพื้นเมืองทางภาคใต้บางแห่งนิยมเรียกว่า " ไทยใหม่ " ซึ่งเป็นที่นิยมชมชอบของชาวน้ำ ความเป็นอยู่ชอบอพยพเคลื่อนย้ายเร่ร่อนอยู่ในทะเลอาศัยอยู่ตามเกาะจึงเรียกว่า " Sea Gypsy "
(สารานุกรมไทยฉบับราชบัณฑิตยสถาน, 2498 เล่มที่ 10 หน้า 6226)

ประวัติความเป็นมาของชาวน้ำ เดิมอาศัยอยู่ตามลุ่มแม่น้ำแยงซีเกียงในประเทศจีน แล้วได้อพยพหลบหนีเร่ร่อนลงมาทางใต้เป็นพวกๆ โดยอาศัยลำน้ำโขง เรื่อยลงมาตลอดแหลมอินโดจีนในการอพยพทำเป็น 2 ระลอกคือพวกแรกได้กลายเป็นต้นตระกูลของบาเทคส์ (Bataks) ในสุมาตราและพวกดยัก (Dyaks) ในเกาะบอร์เนียว ส่วนพวกหลังกลายเป็นต้นกำเนิดของชนชาติบาหลี (Bali) ในปัจจุบันซึ่งบางกลุ่มได้อพยพเลยเข้ามาอยู่ตามเกาะแถบฝั่งตะวันตกของไทยและสืบเชื้อสายมาจนกระทั่งทุกวันนี้ (บี.อาร์.เฟิร์น, 2515)

ประพนธ์ เรืองณรงค์ (2517) ได้รายงานว่าชาวน้ำที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆได้ 3 พวกคือ

1) พวกมะละกา (Malaca) สันนิษฐานว่าพวกนี้เดิมอาศัยอยู่แถบช่องมะละกา

2) พวกลิงคา (Lingga) สันนิษฐานว่าพวกนี้เดิมอาศัยอยู่แถบหมู่เกาะลิงคา

3) พวกมาซิง หรือ พวกสิงห์พวกนี้ส่วนใหญ่อาศัยอยู่แถบเมืองมะริด ทวาย และเกาะต่างๆในเขตสหภาพพม่า ปัจจุบันพวกนี้ยังเร่ร่อนอยู่อาศัยเรือเป็นบ้านส่วนมากมีชีวิตอยู่แบบดั้งเดิม พวกนี้มีอยู่ในประเทศไทยจำนวนน้อย แถบจังหวัดภูเก็ต พังงาและระนอง ชาวน้ำที่อาศัยอยู่ในแถบจังหวัดสตูล กระบี่ พังงา และภูเก็ตในปัจจุบันเป็นชาวน้ำผสมเกือบทั้งสิ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างพวกมะละกากับพวกลิงคาและผสมพวกมาซิงอยู่บ้าง

อุทัย หิรัญโต (2516) ได้รายงานว่ารูปร่างลักษณะและหน้าตาของชาวน้ำจะเห็นว่าคล้ายคลึงกับชาวมลายูผู้ชายผิวค่อนข้างคล้ำไม่สูงไม่ต่ำมากนักหน้าอกกว้างผู้หญิงรูปร่างสูงโปร่ง สัญนิษฐานว่าชาวน้ำเป็นพวกเชื้อชาติมองโกล (Mongoloid) เช่นเดียวกับพวกอินเดียนแดง จีน

พม่า ไทย มลายู อินโดนีเซีย และนิกริโตเป็นต้น ความเป็นอยู่อิสระไม่ชอบคบหาสมาคมกับชนกลุ่มอื่น ชอบอยู่รวมเป็นพวกเดียวกันอพยพเคลื่อนย้ายทำมาหากินไม่เป็นหลักแหล่งมีแบบแผนประเพณี ภาษาเป็นของตนเอง มีหัวหน้าปกครอง และเป็นที่นับถือของคนในกลุ่ม กลุ่มชาวน้ำที่ศึกษาในครั้งนี้อยู่ในเขตท่าฉัตรไชย ตำบลไม้ขาว อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต และ เกาะสิเหร่หรือแหลมตุ๊กแก ตำบลรัษฎา อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต (รูปที่ 2.1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.1 แสดงรูปแผนที่จังหวัดภูเก็ตและบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง

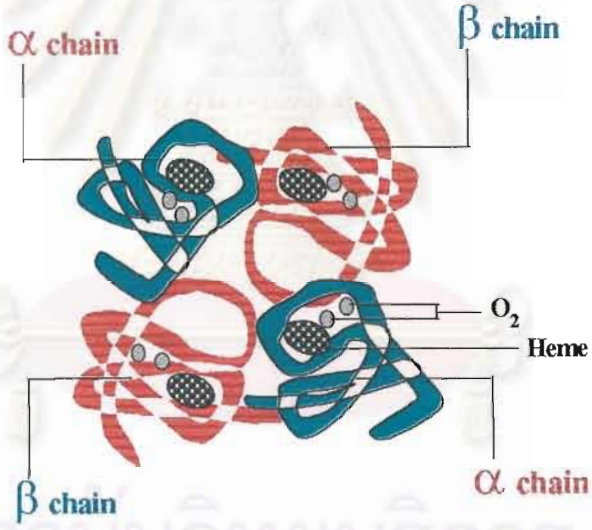
บริเวณท่าฉัตรไชย

บริเวณเกาะสิเหร่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

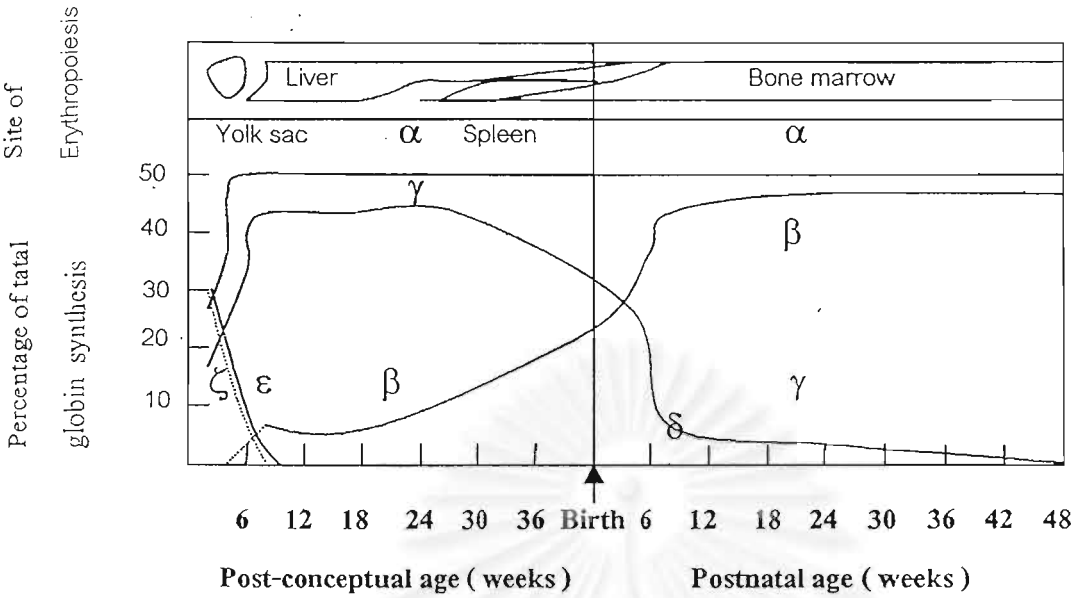
ฮีโมโกลบิน

สุทัศน์ ฟู่เจริญ และปราณีฟู่เจริญ (2541)โมเลกุลของฮีโมโกลบินประกอบไปด้วย 2 ส่วนที่สำคัญคือ heme กับ globin ส่วนที่เป็น heme มีโมเลกุลของเหล็ก และ porphyrin รวมกันเป็น ferroprotoporphyrin complex ส่วนglobin เป็นโปรตีนประกอบด้วย amino acid มาต่อกันเป็นเส้นโพลีเปปไทด์หนึ่งอณูของฮีโมโกลบินประกอบไปด้วย globin chain ที่เหมือนกัน 2 คู่ เช่น Hb A ประกอบด้วย α-globin chain 2 เส้น และ β-globin chain 2 เส้น แต่ละเส้นจะมี heme จับอยู่ 1 โมเลกุล และ heme แต่ละตัวจับออกซิเจนได้ 1 อณู ดังนั้นฮีโมโกลบิน 1 อณูจึงจับกับออกซิเจน 4 อณู ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างจำลองของฮีโมโกลบิน

ชนิดของฮีโมโกลบินที่สร้างขึ้นในร่างกายมีความสัมพันธ์กับขั้นตอนของการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะ embryo จนเป็น fetus และ adult ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงชนิดของฮีโมโกลบินที่สร้างขึ้นในร่างกายมีความสัมพันธ์กับขั้นตอนของการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะ embryo จนเป็น fetus และ adult

โมเลกุลของฮีโมโกลบินที่สังเคราะห์ขึ้นในแต่ละระยะมีดังต่อไปนี้

ระยะ Embryo : Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$)

: Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$)

: Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$)

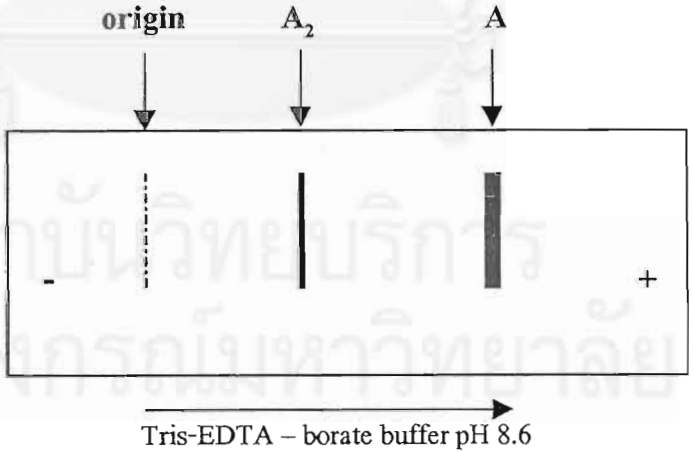
ระยะ Fetus : Hb F ($\alpha_2\gamma_2$)

ระยะ Adult : Hb A ($\alpha_2\beta_2$)

: Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$)

การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

สายโกลบินเหล่านี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ สายแอลฟา-โกลบิน และสายซีต้า – โกลบิน มีกรดอะมิโนจำนวน 141 ตัว ส่วนสายบีตา –โกลบิน เดลต้า - โกลบินและสายแกมมา –โกลบิน มีกรดอะมิโนจำนวน 146 ตัว กรดอะมิโนเหล่านี้มีประจุต่างกันตามชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของสายโกลบิน เมื่อให้ฮีโมโกลบินเหล่านี้วิ่งเข้าไปในสนามไฟฟ้าผ่านตัวกลางที่มี (pH) มากกว่า (pI) ของโกลบินจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ฮีโมโกลบินชนิดต่างๆจะวิ่งเข้าหาขั้วบวกด้วยความเร็วต่างกัน ซึ่งในคนปกติที่มีอายุมากกว่า 1 ปี Hb A จะวิ่งเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า Hb F และ Hb A_2 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจาก Hb A มีประจุลบมากกว่า Hb Fและ Hb A_2 ตามลำดับ แต่เนื่องจาก Hb F มีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นในคนปกติจึงไม่เห็นแถบของ Hb F ซึ่งวิ่งช้ากว่า Hb A เล็กน้อยจึงทำให้เมื่อตรวจดูชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า จะพบแถบฮีโมโกลบิน 2 แถบคือ แถบของ Hb A และ A_2 ดังรูปที่ 2.4 จึงรายงานชนิดของฮีโมโกลบินของคนปกติหลังจากทำการตรวจดูชนิดของฮีโมโกลบิน (Hb typing) ด้วยวิธีการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าว่า A_2A สำหรับการตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินในชาวน้ำครั้งนี้ใช้วิธี cellulose acetate electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้อย่างสะดวกและรวดเร็วโดยใช้แผ่นเซลลูโลสอะซีเตท (cellulose acetate strip) เป็นตัวกลางในการแยกชนิดของฮีโมโกลบินซึ่งทำให้สามารถหาปริมาณของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดได้ด้วย (กุลนภา ฟูเจริญ, 2539)



รูปที่ 2.4 รูปจำลองแถบของฮีโมโกลบิน A และฮีโมโกลบิน A_2 ที่วิ่งในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวกผ่านตัวกลางที่มีพีเอชมากกว่าพีไอ

เยาวลักษณ์ วิไล (2538) ได้เสนอว่าการแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีเซลลูโลสอะซีเตทมีข้อสังเกตุได้ดังนี้

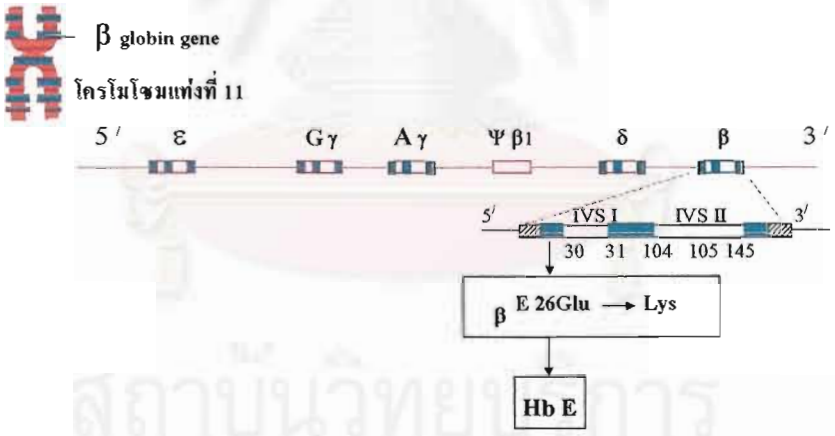
1. การแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีนี้มีข้อเสียคือแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทมีราคาแพงในกรณีที่จำนวนตัวอย่างน้อย อาจตัดแบ่งแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทได้และเนื่องจากวิธีนี้ใช้น้ำละลายฮีโมโกลบินปริมาณน้อย อาจทำให้ตรวจไม่พบฮีโมโกลบินที่มีปริมาณน้อยได้ เช่น ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สพริง (Hb CS) เป็นต้น

2. การย้อมแถบฮีโมโกลบินบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทด้วยสี ponceau S จะติดสีโปรตีนชนิดอื่นด้วยได้แก่ แถบของเอนไซม์ carbonic anhydrase ซึ่งเห็นเป็นแถบ 2 แถบ อยู่ระหว่างจุดที่หยดน้ำละลายฮีโมโกลบิน (origin) กับแถบของ Hb A_2 ทำให้เข้าใจผิดว่าเป็น Hb CS

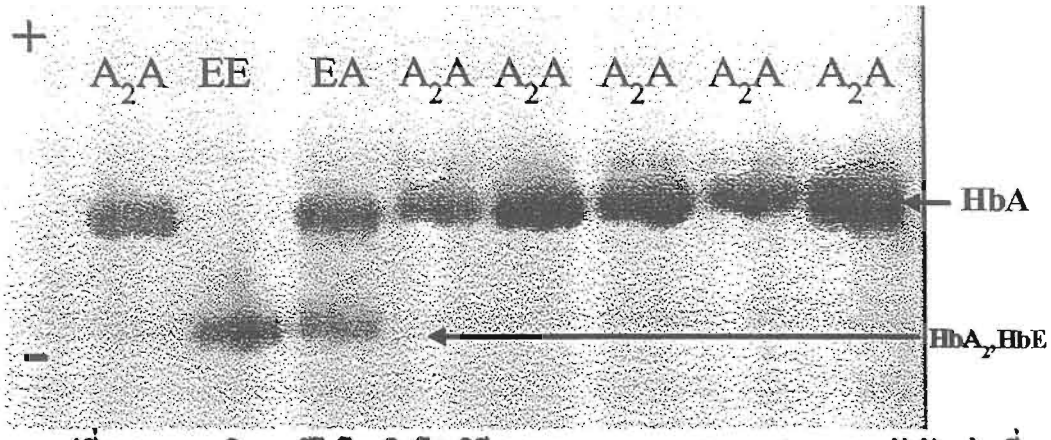
Hb E

ฮีโมโกลบินอี (Hb E) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติเกิดจากการแทนที่เบส G เป็น A ในโคดอนที่ 26 ของยีน β^E-globin ทำให้กรดอะมิโน glutamic acid เปลี่ยนเป็น lysine ($\beta^{E\ 26}$ GAG → AAG : glu→ lys) ดังรูปที่ 2.5 เป็นผลทำให้เกิดฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร Hb E พบมากในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นลักษณะหนึ่งที่สามารถใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของชนกลุ่มต่างๆในบริเวณดังกล่าว จากการศึกษาการกระจายของฮีโมโกลบินดังตารางที่ 1 ทำให้มีผู้ตั้งข้อสังเกตว่า ฮีโมโกลบินอี มีกำเนิดขึ้นมาในบรรพบุรุษของมนุษย์ในบรรพกาล บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เปรียบเสมือนเป็นตรา (hallmark) ของประชากรแถบนี้โดยเฉพาะบริเวณรอยต่อระหว่างประเทศกัมพูชา ไทย และลาวได้ตั้งชื่อบริเวณดังกล่าวว่า " Hb E triangle " (Na-Nakorn and Wasi, 1978) ยีนฮีโมโกลบินอีจะมีอุบัติการค่อนข้างสูงในกลุ่มชนชาติตระกูลมอญ-เขมร (ประเวศ, 2521) ซึ่งในภูมิภาคนี้น่าจะเริ่มต้นจากการเกิดมิวเตชั่นของ Hb A ไปเป็น Hb E ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าการกระจายตัวของ Hb E เป็นผลมาจากการคัดเลือกตามธรรมชาติของฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีผลต่อกลไกการติดเชื้อของโรคมาลเรีย แต่สำหรับชนชาติจีนนั้นมีอุบัติการของฮีโมโกลบินอีที่ต่ำมากหรือไม่พบเลยและแม้แต่ชาวไทยภูเขาซึ่งอพยพเข้ามาอยู่ในประเทศไทย ในช่วงระยะเวลา 200 ปีนี้ก็ไม่มียีนอยู่เลย (Flatz et el ., 1965) การที่ HbE มีประจุลบของฮีโมโกลบินลดลงจึงทำให้มีการเคลื่อนที่ได้ช้า จนอยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับ Hb A_2 เมื่อตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้า ดังรูปที่ 2.6

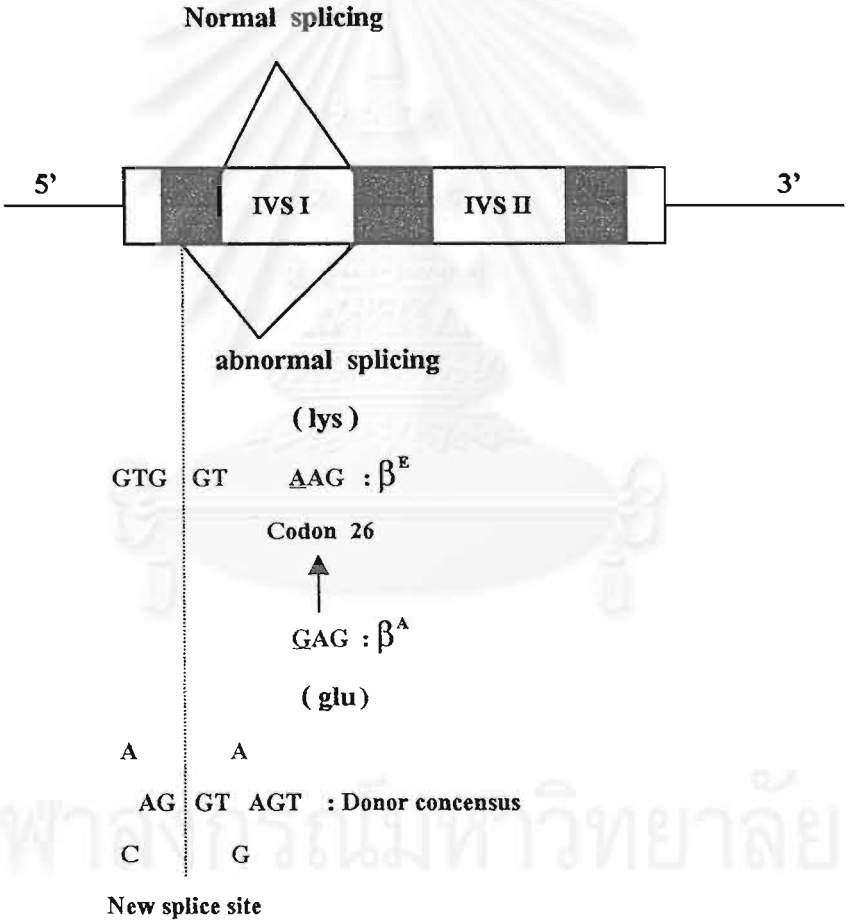
นอกจากนี้ยังพบว่า การเกิดมิวเตชั่นของยีนบีตาโกลบินยังมีผลต่อกระบวนการอาร์เอ็นเอ (RNA processing) โดยเกิดขึ้นในส่วนของดีเอ็นเอ ตำแหน่ง cryptic splice site ในเอ็กซอนหนึ่งซึ่งปกติจะไม่ทำ หน้าที่ แต่เมื่อมีการเกิดมิวเตชั่นที่ตำแหน่ง codon 26 ทำให้นิวคลีโอไทด์ในบริเวณนั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับตำแหน่ง concensus donor splice site ของยีนจึงกระตุ้นให้เกิด abnormal splicing ของmRNA และทำให้เกิด abnormal mRNA ที่ไม่สามารถทำหน้าที่สังเคราะห์สายบีตาโกลบินได้ตามปกติส่วนบริเวณที่เกิด normal splicing เดิมนั้นก็ทำให้เกิดการสังเคราะห์ Hb E ต่อไปได้ดังรูปที่ 2.7 ผลจากการที่มีทั้ง normal splicing และ abnormal splicing เกิดขึ้นในยีนเดียวกันทำให้ยีน Hb E นี้สังเคราะห์สายโกลบินได้น้อยกว่าปกติ เหมือนกับที่พบได้ในยีนบีตาบวกธาลัสซีเมีย ในผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี (Hb EA) และยีน Hb E จึงถูกจัดให้เป็นยีนบีตาบวกธาลัสซีเมีย ชนิดหนึ่งด้วย



รูปที่ 2.5 แสดง Hb E ที่เกิดความผิดปกติที่กลุ่มยีนบีตาโกลบินบนโครโมโซมแท่งที่ 11



รูปที่ 2.6 แสดงชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธี Cellulose acetate electrophoresis ดังตัวอย่างที่ 1, 4 - 8 เป็นชนิดฮีโมโกลบินที่พบได้ในคนปกติที่มีจีโนไทป์ A_2A ตัวอย่างที่ 3 เป็นลักษณะพาหะฮีโมโกลบินอีที่มีลักษณะ จีโนไทป์ EA ตัวอย่างที่ 2 เป็นลักษณะของโฮโมไซโกตอีที่มีลักษณะ จีโนไทป์ EE



รูปที่ 2.7 แสดงตำแหน่ง splicing ที่ผิดปกติในยีนบีตาอีโกลบิน ซึ่งเกิดจากการแทนที่เบส G เป็น A ที่ตำแหน่งโคดอน 26 ทำให้ลำดับเบสของดีเอ็นเอในตำแหน่งดังกล่าวไปคล้ายกับลำดับเบสที่เป็น concensus donor splice site จึงทำให้เกิดตำแหน่ง splice site ใหม่เกิดขึ้นใน exon 1

ตารางที่ 2.1 แสดงค่าเปรียบเทียบจำนวนร้อยละของผู้ที่มี Hb E ที่สำรวจในประชากรแหล่งต่างๆ

ประชากร	จำนวนที่ศึกษา	ร้อยละของผู้ที่มี Hb E	ผู้ศึกษา
ไทย			
อุบลราชธานี	565	44.6	Wasi และคณะ (1967)
ขอนแก่น	150	43.3	Wasi และคณะ (1967)
อุดรธานี	315	36.8	Wasi และคณะ (1967)
ร้อยเอ็ด	760	34.02	พรรณี ชิโนรักษ์และคณะ (2532)
หนองคาย	517	30.94	พรรณี ชิโนรักษ์และคณะ (2533)
บุรีรัมย์	249	42.97	พรรณี ชิโนรักษ์และคณะ (2534)
สุรินทร์	-	53	อ้างตาม Na-Nakorn และ Wasi (1978)
เชื้อชาติจีน	213	0	Na-Nakorn et al (1956)
เชื้อชาติไทย หรือ ไทย-จีน	1006	13.6	Wasi และคณะ (1967)
ภาคกลาง	554	13.3	Wasi และคณะ (1967)
ภาคเหนือ	99	8.0	Wasi และคณะ (1967)
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	49	32.7	Na-Nakorn et al (1956)
ภาคตะวันออกเฉียงใต้	48	8.7	Na-Nakorn et al (1956)
ภาคใต้	126	12.7	Na-Nakorn et al (1956)
ชนกลุ่มน้อย			
ไทยอิสาน	38	26.3	นเรศร์ มุลาลี และคณะ (2525)
ไทยดำ	132	20.5	นเรศร์ มุลาลี และคณะ (2525)
ลาวโซ่ง	58	8.6	กษม อายุการ และคณะ (2538)
ชอง	50	84	เยาวลักษณ์ วิไล (2538)
ลาว			
หลวงพระบาง-เวียงจันทร์	-	17-27	อ้างตาม Na-Nakorn และ Wasi (1978)
ใกล้เขมร	-	4.8	อ้างตาม Na-Nakorn และ Wasi (1978)

ประชากร	จำนวนที่ศึกษา	ร้อยละของผู้ที่มี Hb E	ผู้ศึกษา
เขมร			
กำปงธม	-	6-9	อ้างตาม Na-Nakorn และ Wasi (1978)
สตรังเตรง	-	44-61	อ้างตาม Na-Nakorn และ Wasi (1978)
อินโดนีเซีย	500	3.6	Eng (1955)
ซีลอน	9	22.2	Graff et al (1955)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก (เยาวลักษณ์ วิไล , 2538)

เทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (Polymerase Chain Reaction ; PCR) สุทัศน์ ฟู่เจริญ และปราณี ฟู่เจริญ (2541)

ปี พ.ศ. 2528 K. Mullis จากบริษัท Cetus ในประเทศสหรัฐอเมริกา ค้นพบเทคนิคที่สำคัญมาก คือเทคนิควิธีการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวประมาณ 50-2000 เบสในหลอดทดลองเป็นล้านเท่าโดยอาศัยเอ็นไซม์และ ดีเอ็นเอ template เทคนิคนี้เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งปฏิกริยามีองค์ประกอบที่สำคัญ 5 อย่างคือ

1. ดีเอ็นเอ template ได้แก่ ดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเพื่อเป็นแม่แบบสำหรับการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่

2. Primer เป็น oligonucleotide ท่อนสั้นๆขนาดประมาณ 18-30 เบส ซึ่งมีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary) กับลำดับเบสในดีเอ็นเอ template ทางด้าน 5′เส้นหนึ่งและทางด้าน 3′ ของ ดีเอ็นเอ template อีกเส้นหนึ่ง

3. Substrate ได้แก่ deoxynucleotide triphosphate 4 ชนิด คือ dATP , dGTP , dCTP และdTTP ซึ่งจะต้องมีความเข้มข้นเท่าๆกัน (equimolar) ในปฏิกริยา

4. Taq polymerase เพื่อสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่

5. Buffer ที่มีส่วนประกอบของ $MgCl_2$ เพื่อ optimize การทำงานของ DNA polymerase

ขั้นตอนสำหรับปฏิกริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. Denaturation คือการคลายเกลียวของดีเอ็นเอเส้นคู่ออกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวด้วยความร้อน (ประมาณ 95 องศาเซลเซียส)ขึ้นกับชนิดของดีเอ็นเอ template

2. Annealing คือการที่ primer เข้าไปจับ (anneal) กับ ดีเอ็นเอ template บริเวณที่มีเบสคู่สมเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่เหมาะสม คือประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าอุณหภูมิแยกตัว (Tm) ของ primer [Tm = 2 (A+T) + 4 (G+C)]

3. Extension คือการเพิ่มเบส (A, G, C, T) เข้าไปที่ปลายข้าง 3′-end ของ primer และสร้างดีเอ็นเอเส้นคู่ชุดใหม่ที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอ template เดิม โดย Taq polymerase ปกติ Taq polymerase จะเร่งปฏิกริยาการสร้าง phosphodiester bond ได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนมีผลต่อ PCR product อุณหภูมิที่สูงจะเพิ่มความจำเพาะ (specificity) ปริมาณ (yield) และ ความไว (sensitivity) ของปฏิกริยานอกจากนั้นอุณหภูมิที่สูงโดยเฉพาะในขั้นตอน denaturation จะทำให้การคลายเกลียวของดีเอ็นเอที่มี G+C content สูงเกิดเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวได้สมบูรณ์ขึ้น

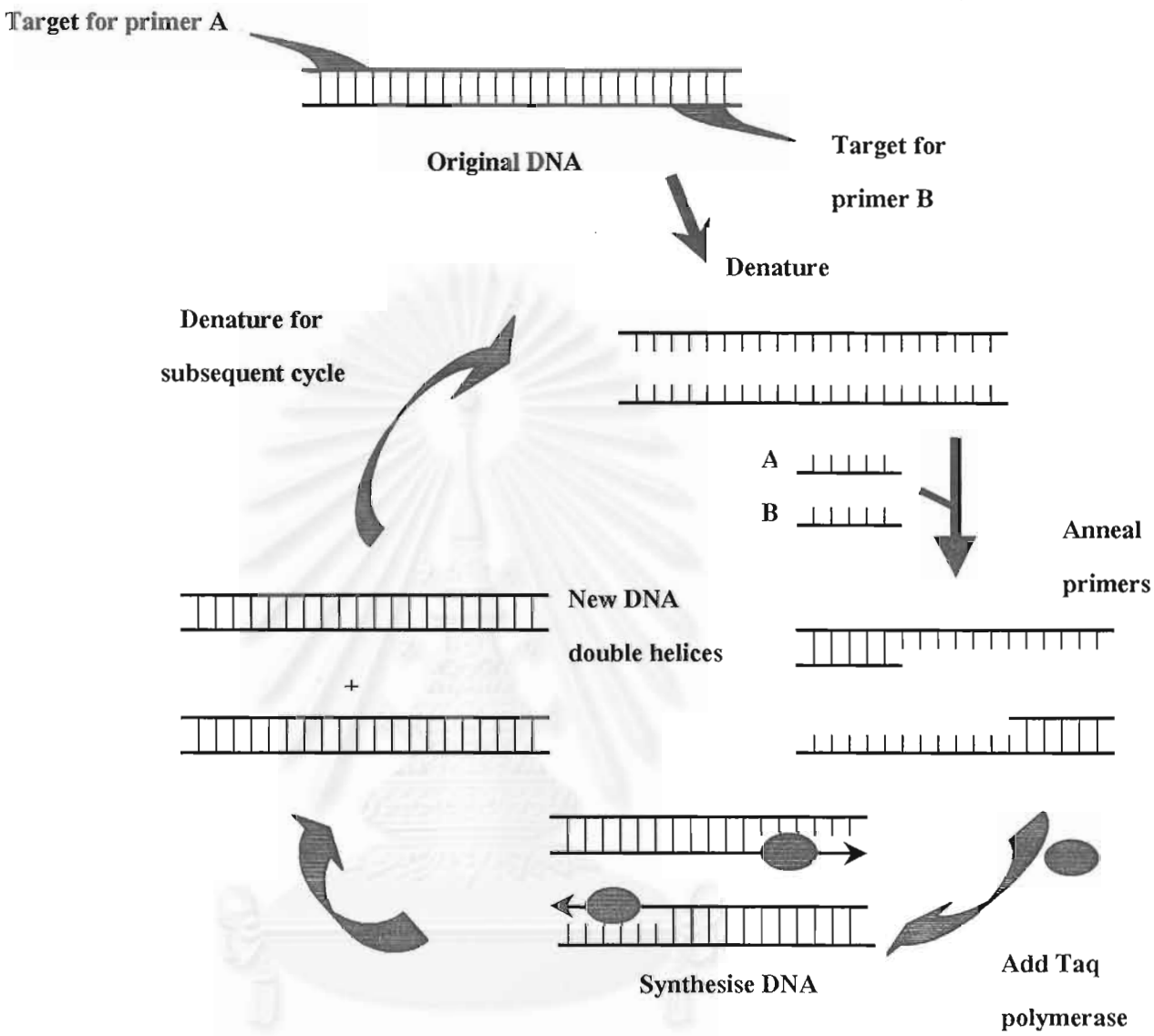
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมาต้มให้ร้อน ดีเอ็นเอเส้นคู่จะคลายเกลียวออกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวแต่เมื่อลดอุณหภูมิลงให้ต่ำกว่า Tm ของ primer ประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส primers ที่มีอยู่ในหลอดทดลองจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนทางด้าน 5′และ 3′ของเนื้อยีนที่มีเบสคู่สมกับ primer ดีเอ็นเอเดิมจะทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เอ็นไซม์ Taq polymerase ในหลอดทดลองจะทำให้เกิดปฏิกริยาที่เรียกว่า Polymerase Chain Reaction คือจะมีการจับเอานิวคลีโอไทด์ ในหลอดทดลองมาต่อกับ primer แต่ละข้างเพื่อสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ ที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดในปฏิกริยาในรอบแรกจะมีดีเอ็นเอถูกสร้างใหม่อีก 1 คู่จากดีเอ็นเอ template เดิม 1 คู่

หลังจากปฏิกริยาดังกล่าวในรอบแรกนี้แล้วก็เริ่มรอบที่สองโดยการทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 95 องศาเซลเซียสอีก ดีเอ็นเอทั้งหมดที่อยู่ในหลอดทดลองก็จะแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว 4 เส้น ซึ่งเมื่อลดอุณหภูมิลงดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวก็จับกับ primers ซึ่งมีอยู่ในปริมาณมากกว่า ดีเอ็นเอ template ประมาณ 1 ล้านเท่าทำให้ Taq polymerase สามารถเร่งปฏิกริยาการเพิ่มเบสที่ปลายข้าง 3′-end ของ primer จนเกิดดีเอ็นเอเส้นคู่ชุดใหม่จำนวน 4 ชุด ดีเอ็นเอดังกล่าวจะแยกเป็นเส้นเดี่ยว 8 เส้น เมื่ออุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสอีก ซึ่งจะจับกับ primer สร้างเป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ 16 ชุด เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบทวีคูณในปริมาณ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกริยา เมื่อปฏิกริยาดำเนินไปได้ 20 รอบจะได้ดีเอ็นเอปริมาณ 2^{20} ชุดหรือประมาณ 1 ล้านเท่าของดีเอ็นเอเริ่มต้นภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง ทั้งนี้เพราะปฏิกริยาพีซีอาร์แต่ละรอบใช้เวลาเพียงไม่เกิน 5 นาทีวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการศึกษาตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอปริมาณน้อยดังรูปที่ 2.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

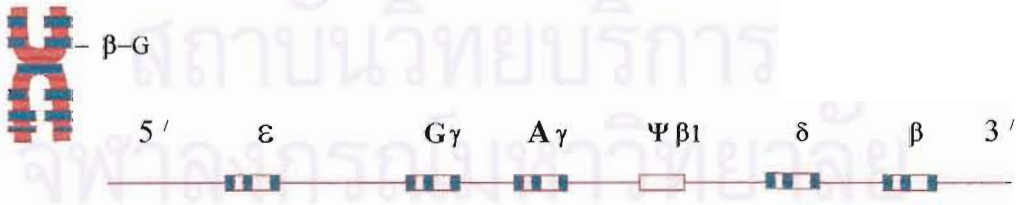


รูปที่ 2.8 แสดงหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

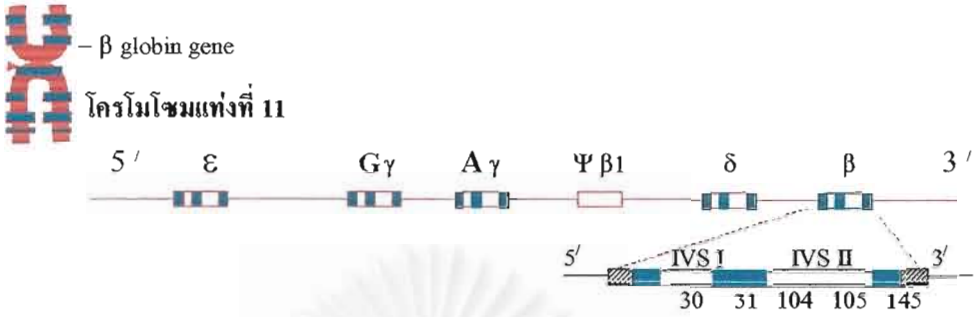
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene cluster)

สุทัศน์ ฟู่เจริญและปราณี ฟู่เจริญ (2526)ได้ศึกษายีนในกลุ่ม Beta ที่ควบคุมการสร้างฮีโมโกลบินของมนุษย์ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 มีขนาดประมาณ 50 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน 6 ยีน เรียงลำดับจาก 5′ของสาย DNA ไปยัง 3′ดังนี้ ε-$^{G}\gamma$ - $^{A}\gamma$ - $\psi\beta_1$ - δ - β ดังรูปที่ 2.9 β-globin gene และ δ- globin gene เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง β-globin chain และ δ-globin chain และ γ-gene ทั้ง 2 ยีนควบคุมการสร้าง γ- globin chain ส่วน ε-gene ควบคุมการสร้าง ε-globin chain ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินใน embryo ยีน $\psi\beta_1$ มีลักษณะการเรียงตัวของ base คล้ายคลึงกับ β-gene แต่ไม่สามารถทำหน้าที่สร้าง ε-globin chain ได้ จึงเรียกยีนเช่นนี้ว่า pseudogene globin gene แต่ละอันประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น coding sequence หรือ exon และจะมีส่วนที่เป็น noncoding sequence เรียกว่า intron หรือ intervening sequence (IVS) แทรกอยู่ 2 แห่งในเนื้อยีน ยีนในกลุ่ม β-globin มี small intron (IVS I) ขนาด 122-130 คู่เบส แทรกอยู่ระหว่าง codon ของ amino acid ตำแหน่งที่ 30 กับ 31 และ large intron (IVS II) ขนาดประมาณ 850-900 คู่เบ แทรกอยู่ระหว่าง codon ของ amino acid ตำแหน่งที่ 104 กับ 105 รอยต่อระหว่าง exon และ intron เรียกว่า splice junction ซึ่งยีนแต่ละตัวในกลุ่มนี้ได้รับการโคลนและหาลำดับของนิวคลีโอไทด์เบสไว้หมดแล้ว ข้อมูลพื้นฐานนี้มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาควบคุมการแสดงออกของยีน การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนตลอดจนการศึกษามิวเตชั่นและโพลีมอร์ฟิสมที่เกิดขึ้นในยีนแต่ละชนิด (Fucharoen, S and Fucharoen,G., 1991) ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.9 แสดง กลุ่มยีนบีตาโกลบินที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 11



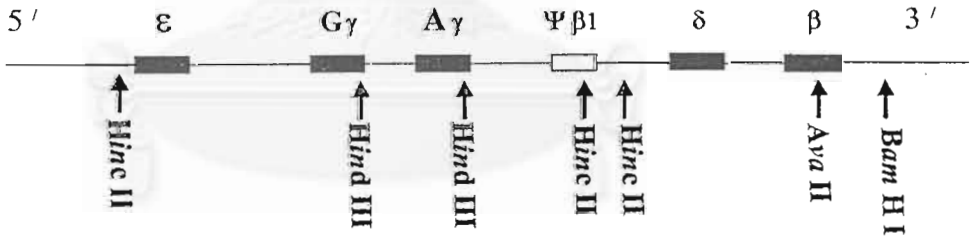
รูปที่ 2.10 แสดงภาพขยายยีนบีตาโกลบิน

ลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตาโกลบิน

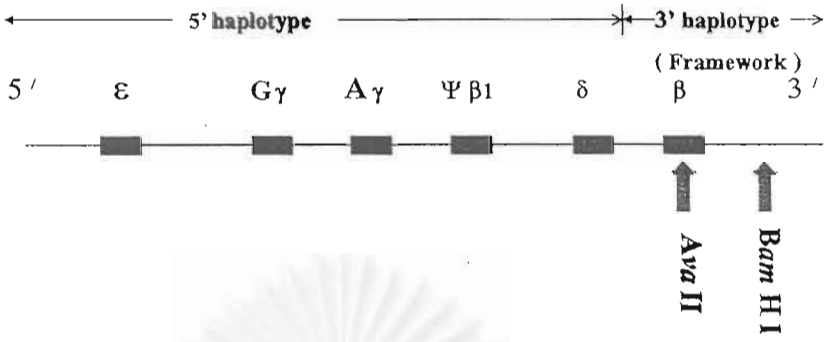
ในประชากรใดๆถ้าพบว่าบน locus หนึ่งมี DNA sequence ที่แตกต่างกันนี้อยู่เกินร้อยละ 1 ของประชากร จะเรียก DNA บริเวณนั้นว่า DNA polymorphism ซึ่งดีเอ็นเอ ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินมี DNA polymorphism เกิดขึ้นหลายแห่งสามารถตรวจสอบได้ 2 วิธี วิธีที่ 1 โดยทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ซึ่งเทคนิคทางโมเลกุลสามารถทำได้โดยการโคลนบางชิ้นส่วนในจีโนม (genome) ของมนุษย์ (Maniatis และคณะ, 1978) วิธีที่ 2 ตรวจสอบได้โดยการทำ electrophoresis และ Southern blot แล้วตรวจด้วย DNA probe (Spense และคณะ, 1982) โดยวิธีนี้ทำให้เราทราบว่าที่ locusหนึ่งๆในแต่ละคนอาจจะมี nucleotide หรือ base บางตัวใน DNA sequence แตกต่างกันโดยทั่วไปเราจะไม่ทราบว่าผู้ใดมี DNA sequence แตกต่างไปเพราะ nucleotide ที่แตกต่างกันนี้ส่วนใหญ่จะเป็น single base substitution และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของ amino acid หรือไม่ทำให้หน้าที่ในการควบคุมการสร้าง globin ผิดปกติไป ในปี ค.ศ. 1978 Lawn และคณะกับ Kan และ Dozy ค้นพบ DNA polymorphism ภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบินถึง 17 ตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงของเบสที่เป็น DNA polymorphism อาจจะไปเปลี่ยน restriction site ของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Orkin และ Kazazian, 1984) แต่ละตำแหน่งของโพลีมอร์ฟิสม อ่านผลได้โดยดูการตัดได้ (+, presence) หรือตัดไม่ได้ (-, absence) ของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งนั้นๆรูปแบบ (pattern)ความสัมพันธ์ของ RFLPs บนโครโมโซมนี้เรียกว่า

แฮปโพลไทป์ (haplotypes) (Orkin, Kazazian, Goff และ Antonarakis และคณะ, 1982) ดังรูปที่ 2.11 Antonarakis และคณะ (1982a) .ให้คำจำกัดความคำว่า haplotype ว่า " The pattern or combination of polymorphic restriction sites for any chromosome " เมื่อให้ n เป็นจำนวนของ polymorphic restriction sites ดังนั้นรูปแบบแฮปโพลไทป์ที่เป็นไปได้ 2^n รูปแบบ การวิเคราะห์ polymorphic restriction sites ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินพบแฮปโพลไทป์เพียงไม่กี่รูปแบบทำให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์แบบสุ่ม เนื่องจากมี linkage disequilibrium

Orkin, Kazazian, Antonarakis, Oster และคณะ(1982) ศึกษา DNA haplotypes ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินโดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือส่วนที่ 1 จากปลายด้าน 5′ ไปถึงยีนบีตาโกลบินเรียกว่า 5′ haplotype และ ส่วนที่ 2 จากปลายด้าน 3′ถึงยีนบีตาโกลบินเรียกส่วนนี้ว่า 3′ haplotype หรือ β globin gene frameworks (FW) ลักษณะของ framework ที่พบมีอยู่ 3 แบบคือ FW 1 (AvaII +, BamHI +) FW 2 (AvaII +, BamHI -) และ FW 3 (AvaII -, BamHI +) สำหรับผู้ที่เป็น heterozygote ทั้ง 2 ตำแหน่ง (AvaII +/-, BamHI +/-) จัดให้เป็นชนิด FW 2 หรือชนิด FW 3 ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.11 แสดงตำแหน่งของ DNA polymorphism ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินและจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆที่ปรากฏในแต่ละตำแหน่ง



รูปที่ 2.12 แสดงตำแหน่ง 5' haplotype กับ 3 ' haplotype หรือ Framework และรูปแบบของFW 1, FW2, FW3 และ FW 2/3 ที่ได้จากการตัดได้ (+) หรือไม่ได้ (-)ของ restriction enzyme ที่ตำแหน่งจุดตัดจำเพาะ

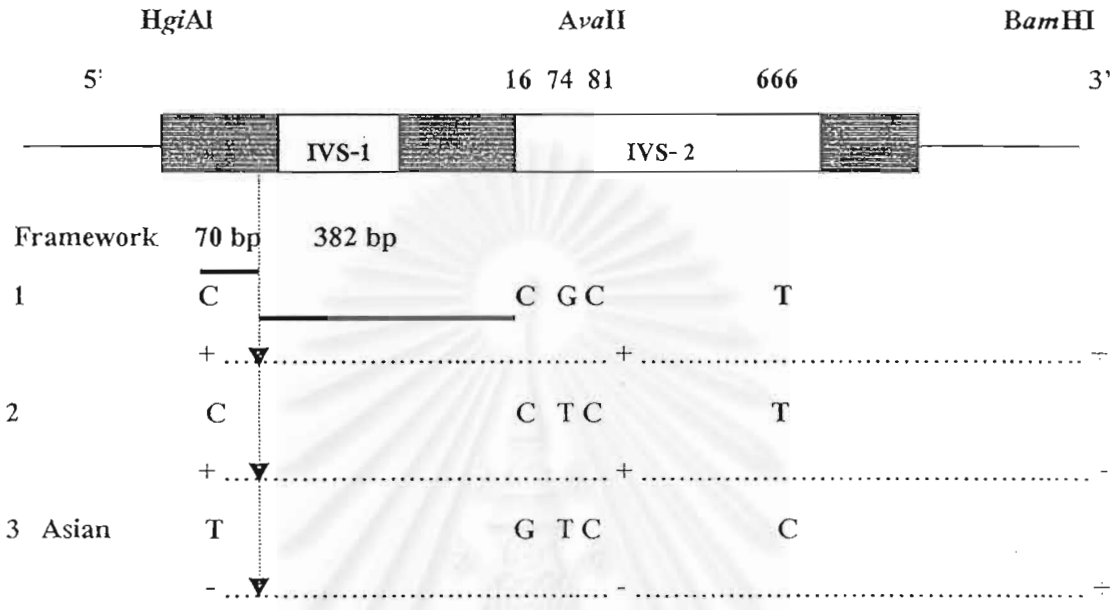
β - globin gene frameworks มีความแตกต่างกันในลำดับของนิวคลีโอไทด์ ทำให้ได้รูปแบบ frameworks ที่แตกต่างกันไป โดย FW1 และ FW2 แตกต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 74 ซึ่งจะพบในชาวคอเคเซี่ยน (Caucasians) และชาวเอเซี่ยน (Asian) สำหรับ FW 3 (Asian) และ FW 2 ต่างกันโดยเกิดการเปลี่ยนแปลง 3 นิวคลีโอไทด์ โดยเกิดที่ตำแหน่ง codon ที่ 2 ของ exon 1 และบริเวณ IVS-2 ที่ตำแหน่ง 16 และตำแหน่ง 666 (Higg และคณะ, 1984) ดังรูปที่ 2.13

Antonarakis และคณะ (1982) ได้เสนอว่ากลไกสำคัญที่ทำให้ประชากรบริเวณเดียวกันมี β - globin gene frameworks ต่างกันน่าจะเกิดจาก

1. crossing over
2. separate mutation
3. gene convertion

นอกจากนี้ ยังสรุปว่าการเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก FW2 ไปเป็น FW 3 หรือ FW3 ไปเป็น FW 2 นั้นจะต้องเกิด crossing over ถึง 2 ครั้ง โดยอาศัยการเกิดในช่วง 382 นิวคลีโอไทด์ เริ่มจากโคดอนที่ 26 ตลอดจนถึงตำแหน่ง *Ava* II site ในบริเวณ IVS-2 ซึ่งเป็นช่วงสั้นมากสำหรับการเกิด crossing over ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการมี β - globin gene frameworks ต่างกัน แสดงว่ายีนบีตาโกลบินมีต้นกำเนิดต่างกัน (independent origin)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.13 ไดอะแกรมโครงสร้างของยีนบีตาโกลบินแสดงชนิด β - globin gene frameworks ที่แตกต่างกันในลำดับนิวคลีโอไทด์โดยที่ FW1 และ FW2 แตกต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 74 ของ IVS-2 พบในชาวคอเคเซี่ยน สำหรับ FW 3 (Asian) มีการเปลี่ยนแปลง 3 นิวคลีโอไทด์ จาก FW2 โดยเกิดที่ตำแหน่งโคดอนที่ 2 ของ exon 1 และบริเวณ IVS-2 ที่ตำแหน่ง 16 และตำแหน่ง 666

เครื่องหมาย ▼ หมายถึง ตำแหน่งของยีนบีตาอี

(+) และ (-) หมายถึง การตัดได้และตัดไม่ได้ของเอนไซม์ตัดจำเพาะบน polymorphic restriction sites

▬ หมายถึง ส่วน exon

□ หมายถึง ส่วน introns หรือ intervening sequence (IVS)

Orkin และคณะ (1982) พบว่า polymorphic sites ทั้ง 5 ตำแหน่ง ในส่วนปลายของดีเอ็นเอด้าน 5' ตลอดจนถึงตำแหน่งของยีนบีตาโกลบิน โดยเริ่มต้นจากตำแหน่ง Hinc II site จนถึง H*ind* III site มีความสัมพันธ์กันแบบ nonrandomly ช่วงระหว่างส่วน 5' haplotype และส่วนของ 3' haplotype มีความเป็นอิสระต่อกัน (independent association) เนื่องจากเป็นบริเวณที่เกิด recombination ได้ง่าย เรียกบริเวณส่วนนี้ว่า " hot spot region " มีช่วงความยาวดีเอ็นเอประมาณ 9.0 กิโลเบส (Chakravati และคณะ, 1984) ทำให้ได้แฮปโพลไทป์ต่างกัน ลักษณะแฮปโพลไทป์ที่ตรวจพบสามารถบอกถึง chromosome background ของยีนบีตาโกลบินได้และสามารถบอกความสัมพันธ์กันในแต่ละกลุ่มชาติพันธ์เพื่อบอกถึงจุดกำเนิดหรือการมีบรรพบุรุษร่วมกันได้

Hundrieser และคณะ (1988) ได้ศึกษา DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน ของประชากรในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 3 กลุ่ม ได้แก่ ประชากรทางภาคเหนือของประเทศไทย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และ ชาวเขมรที่ศูนย์อพยพทางชายแดนไทยเขมร พบว่าประชากรทั้ง 3 กลุ่ม มีลักษณะ 5' haplotype เหมือนกันเป็นแบบ (+ - - - - +) สำหรับลักษณะของ FW ของประชากรทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเป็นแบบ FW 2 ในชาวเขมรที่ศูนย์อพยพจะพบ FW1 FW 2 FW 3 เปอร์เซนต์ใกล้เคียงกัน

Fucharoen และคณะ (1997) ได้ศึกษา DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบินในชนกลุ่มน้อยในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และติดตามด้วยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 7 ตำแหน่ง พบว่าชนกลุ่มน้อยในประเทศไทย มีลักษณะ 5' haplotype เหมือนกันเป็นแบบ (+ - - - -) เป็นส่วนมากซึ่งเป็นแบบที่พบได้มากในประชากรแถบเอเชียและประเทศในยุโรปยกเว้นแอฟริกา (Flint และคณะ, 1993) ลักษณะของ FW ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ FW1 FW2 FW3 เปอร์เซนต์เท่าๆกัน ภูไท พบ FW 2 ลาวโซ่งพบ FW 3 เยาวลักษณ์ วิไล และคณะ (2538) ได้ทำการศึกษาในกลุ่มซาไกพบ FW 2 ส่วนชองพบ FW 3 ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงการกระจายลักษณะแฮปโพลไทป์ และ framework ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินเอในชนกลุ่มน้อยต่างๆในประเทศไทย

β^A-haplotype	Framework	No. of chromosome						
		North	North-east	Hill tribes	Phu Tai	Chong	Sakai	Lao Song
(+----++)	1	7	8	10	5	-	-	8
(-++-+++)	1	1	-	-	1	2	-	4
(-+-++++)	1	2	3	4	1	1	10	-
(+----+-)	2	8	8	53	27	2	26	26
(-++-++-)	2	-	-	-	-	-	-	3
(-+-+++-)	2	1	-	9	1	4	3	4
(+-----+)	3	13	8	53	5	24	4	58
(-++-+-+)	3	3	-	6	1	-	-	1
(-+-++-+)	3	1	-	8	1	2	16	7
(-+--+-+)	3	1	-	3	1	4	1	-
(-+----+)	3	-	-	2	-	-	1	-
Total no. of chromosomes:		37	27	148	43	39	61	111

ที่มา : (Fucharoen และคณะ, 1997)

Yongvanite และคณะ (1989) ได้กล่าวไว้ว่าในการทำการศึกษา DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน ของประชากรในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบลักษณะของ 5' haplotype เป็นแบบ +----+ เป็นส่วนมาก และ FW ที่พบมีทั้ง 3 แบบคือ FW 1, FW 2, FW 3

Yongvanite และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษา DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน จำนวน 8 restriction site ในเด็กนักเรียนชาวโส้อายุ 10-14 ปี จำนวน 118 คน จากหมู่บ้านใน อำเภอกุสุมาลย์ จังหวัดสกลนคร ซึ่งชาวโส้อยู่ในตระกูลออสโตรเอเชียติก พบลักษณะของ 5' haplotype เป็นแบบ (+ - - - - +) และ FW ที่พบคือ FW 2 สำหรับ DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน จำนวน 8 restriction site ในประชากรทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ใช้เป็น control เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ พบลักษณะของ 5' haplotype หลายแบบมาก ส่วน FW ที่พบคือ FW 3

Yongvanite และคณะ (1989) ได้กล่าวไว้ว่าในการทำการศึกษา DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน ของประชากรในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบลักษณะของ 5' haplotype เป็นแบบ (- + - + + +) เป็นส่วนมาก และ FW ที่พบคือ FW3(Asian) ซึ่งจะพบได้ในชาวเขมร (Hundrieser และคณะ 1988b)

ในปีเดียวกันนี้ Yongvanite และคณะได้ทำการศึกษา DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน จำนวน 8 restriction site ในเด็กนักเรียนชาวโส้อายุ 10-14 ปี จำนวน 118 คน จากหมู่บ้านใน อำเภอกุสุมาลย์ จังหวัดสกลนคร พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบบ (- + - + + +) และ(+ - - - - +) และ FW ที่พบคือ FW 2 สำหรับ DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน จำนวน 8 restriction site ในประชากรทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ใช้เป็น control เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ พบลักษณะของ 5' haplotype ส่วนใหญ่เป็นแบบ (- + - + + +) และ (+ - - - - +) สำหรับ FW ที่พบคือ FW 2

Stylianos E. และคณะ (1982) ได้ทำการศึกษา DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน จำนวน 9 restriction site ในชาวเขมร 3 กลุ่มคือ 1. กลุ่มเขมรอพยพที่เขาอีด่างที่มีถิ่นฐานดั้งเดิมอยู่ที่กรุงพนมเปญ 2. กลุ่มเขมรที่อยู่ที่กรุงวอชิงตันดี.ซี. 3. กลุ่มชาวไทย, ลาว, เขมร ที่อาศัยอยู่ในประเทศกัมพูชา พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบบ (- + - + + + -)และ FW ที่พบคือ FW 3 (Asian) แต่ในชาวไทย ลาว เขมร ที่อาศัยอยู่ในประเทศกัมพูชาพบว่า DNA haplotype ส่วนใหญ่เป็นแบบ (- + - + + + +) และ (+ - - - - + +) สำหรับ FW ที่พบคือ FW 2 แสดงให้เห็นถึงการมีต้นกำเนิดของ β^E globin gene ต่างกันเพราะลักษณะของ FW ที่พบ พบได้ทั้ง FW 2 และ FW 3 (Asian) แสดงว่าน่าจะเกิดจาก 1) recurrent mutation 2) double crossing over และ 3) two single crossing over

Fucharoen และคณะ (1997)ได้ศึกษา DNA haplotype ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบินในชนกลุ่มน้อยในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และติดตามด้วยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 7 ตำแหน่ง พบว่าชนกลุ่มน้อยในประเทศไทย มีลักษณะ 5' haplotype เป็นแบบ (- + - + +) และ (+ - - - -)และมี FW เป็นแบบ FW 2 ยกเว้นในชาวชองจะพบลักษณะ 5' haplotype เป็นแบบ (- + - + +) และมี FW เป็นแบบ FW 3 (Asian) ซึ่งจะพบได้ในชาวเขมร ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงการกระจายลักษณะแฮปโพลไทป์ และ FW ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินเอในชนกลุ่มน้อยต่างๆในประเทศไทย

β^E-haplotype	Framework	No. of chromosomes						
		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 no. of chromosomes		3	13	2	19	59	3	4

หมายเหตุ * และ ** เป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ที่พบได้เสมอในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประชากรชาวเขมร

ที่มา : (Fucharoen และคณะ, 1997)

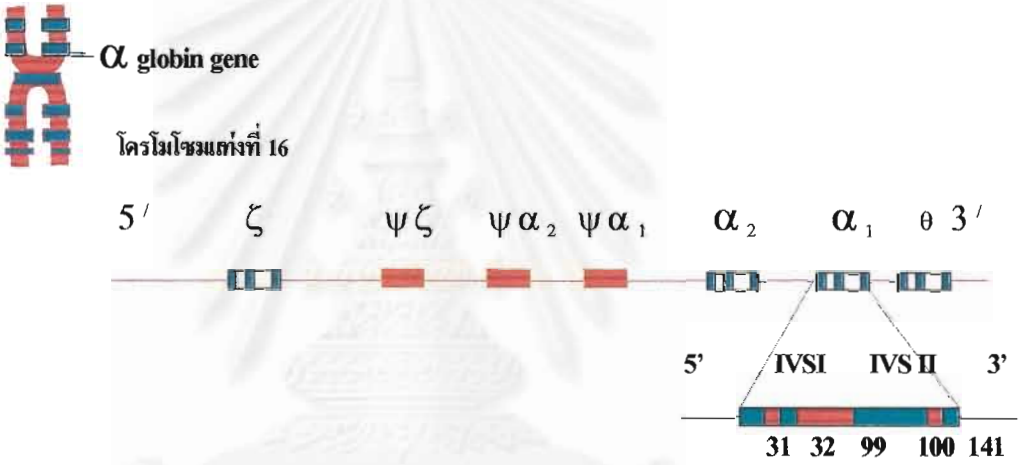
กลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน (α-globin gene cluster)

ยีนในกลุ่มแอลฟาที่ควบคุมการสร้างฮีโมโกลบินอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 25 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน 5 ยีน เรียงลำดับจาก 5' ของสายดีเอ็นเอไปยังปลาย 3' ดังนี้ 5'- ζ - $\psi\zeta$- $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$- α_2- α_1 -3' ดังรูปที่ 2.14 α-globin gene ทั้ง 2 ยีนทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง α-globin chain ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) ของทารกในครรภ์และของ Hb A ($\alpha_2\beta_2$) และพบว่ายีน α_2 และ α_1 มีลำดับเบสที่เหมือนกันมาก (homology sequence) สำหรับ ζ - gene ทำหน้าควบคุมการสร้าง ζ- globin chain ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮีโมโกลบินใน embryo จะเห็นว่ายีน α-globin gene มี 2 ตำแหน่ง (2 loci) คนปกติจึงมียีน α อยู่ 2 คู่ หรือ 4 ยีน ($\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$) จากการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลพบว่ายีนแอลฟาโกลบินทั้งสองสังเคราะห์โกลบินโปรตีนเหมือนกัน

Bunn , Forget และ Ranney , 1997 ; Licbhaber และ Kan , (1981) ได้ศึกษาระดับของ α - mRNA พบว่า α_2 - globin mRNA มีมากกว่า α_1 -globin mRNA ถึง 2.8 เท่า แสดงให้เห็นว่ายีน α_2 สามารถสังเคราะห์สายแอลฟาโกลบินในปริมาณที่มากกว่ายีน α_1 เมื่อเกิดมิวเตชั่นที่ยีน α_2 พบว่าฟีโนไทป์ที่ปรากฏรุนแรงกว่าเกิดมิวเตชั่นที่ยีน α_1 ส่วนยีน $\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$, $\psi\alpha_2$ มีลักษณะการเรียงตัวของเบส คล้ายคลึงกับ ζ - gene และ α- gene แต่ไม่สามารถทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สายโกลบินเรียกว่า pseudogene

รูปที่2.14แสดงกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 16

Globin gene แต่ละอันประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น coding sequence หรือ exon และจะมีส่วนที่เป็น noncoding sequence เรียกว่า intron หรือ intervening sequence (IVS) แทรกอยู่ 2 แห่งในเนื้อยีน ดังรูปที่ 2.15 α-globin gene มี small intron (IVS I) ซึ่งมีความยาว 95 คู่เบสแทรกอยู่ระหว่าง codon ของ amino acid ที่ 31 กับ 32 และ large intron (IVS II) ขนาดประมาณ 140-149 คู่เบสแทรกอยู่ระหว่าง codon ของ amino acid ที่ 99 กับ 100 intron ของ ζ- gene ยาวกว่า α- gene คือประมาณ 1.2 และ 0.3 กิโลเบสตามลำดับ



รูปที่ 2.15 แสดงกลุ่มยีนแอลฟาโกลบินที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 16 รูปขยายแสดงตำแหน่งของ coding sequence และ noncoding sequence

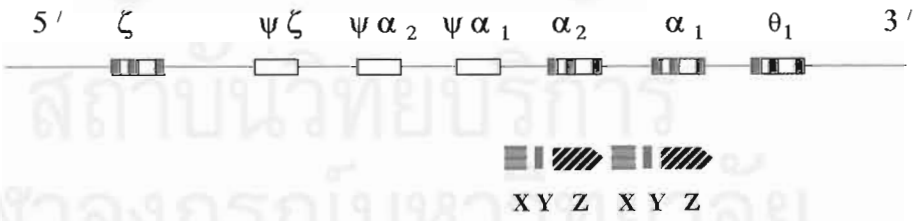
Alpha - thalassemia

ภาวะที่มีการสร้าง α-globin chain น้อยลงหรือไม่มีการสร้างเลย ส่วนใหญ่เกิดจากมีการขาดหายไป (deletion) ของ α-globin gene

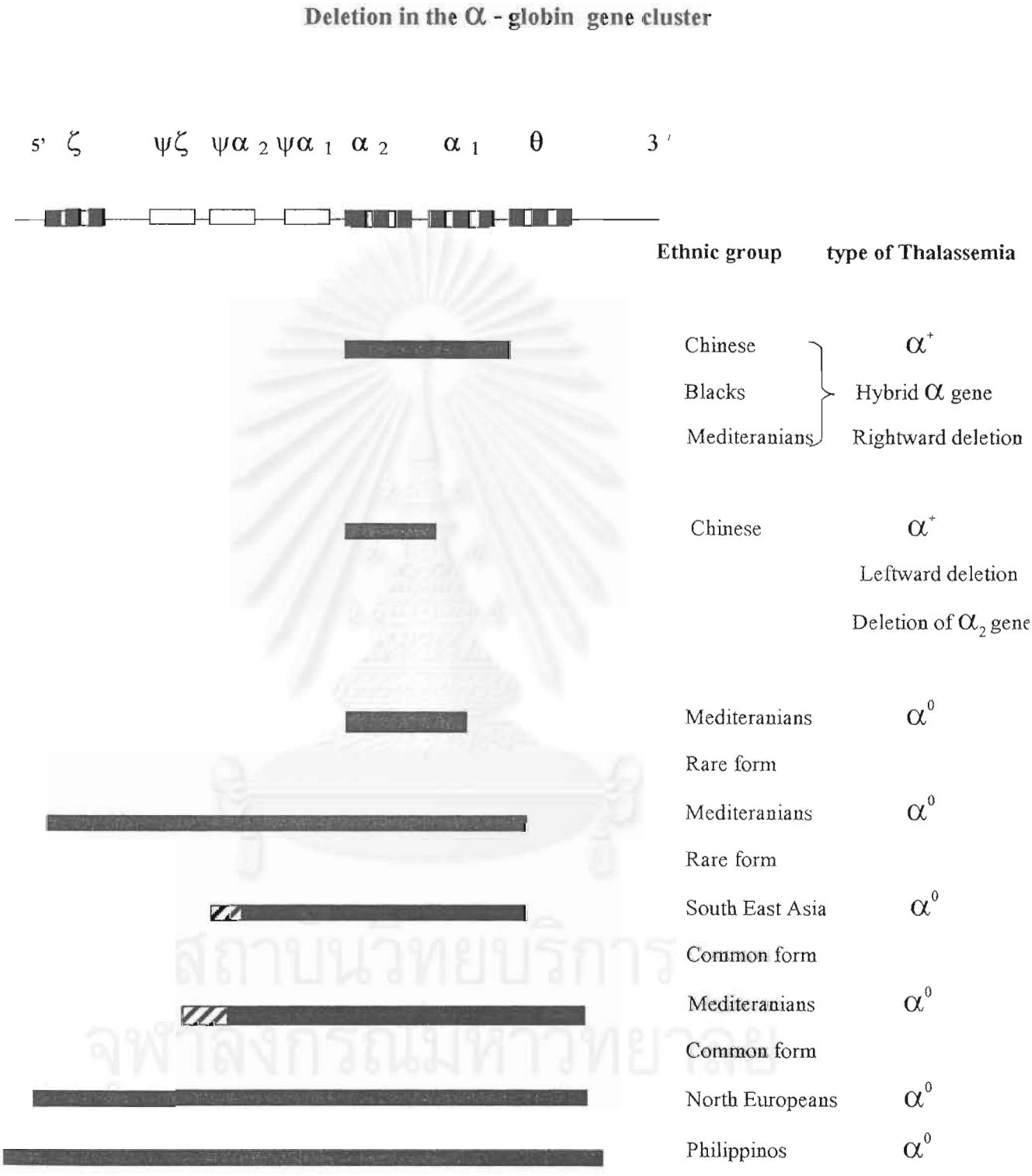
Gene Deletion

ขนาดของ α-globin gene ที่ขาดหายไปมีต่างๆกัน เกิดเป็น α - thalassemia ชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 2.17

1. α - thalassemia 1 (α^0 – thalassemia) เกิดจากการขาดหายไปของ α - globin gene ทั้ง 2 อันที่อยู่บนโครโมโซมข้างเดียวกัน (- -) ซึ่งจะไม่มีการสร้าง α - globin chain จากโครโมโซมข้างนี้เลย ขนาดของดีเอ็นเอที่ขาดหายไปนี้ อาจจะครอบคลุมเฉพาะบริเวณของ α - globin gene หรืออาจจะเลยไปถึง ζ- globin gene ส่วนการขาดหายไปของดีเอ็นเอ ที่รวมเอา α_1 และ α_2 globin gene ซึ่งทำให้เกิด α - thalassemia 1 นั้นเกิดจากการย้ายสลับที่ของดีเอ็นเอระหว่างดีเอ็นเอแบบไม่มีกฎเกณฑ์ (illegitimate recombination หรือ non – homologous recombination) เพราะกลุ่ม α - globin gene มีดีเอ็นเอที่เป็น repetitive sequence (ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกันเป็นกลุ่มๆ) ดังรูปที่ 2.16 สำหรับ α - thalassemia 1 ในประเทศไทยและในประเทศแถบ Southeast Asia เกิดจากการที่ดีเอ็นเอตั้งแต่บริเวณที่เป็น ψζ - globin gene จนถึง α - globin gene ทั้งสองอันขาดหายไปประมาณ 20 กิโลเบส จึงเรียกกันโดยทั่วไปว่า Southeast Asia type (- - SEA) ดังรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.16 แสดงตำแหน่ง Homology sequence (X, Y, Z boxes)



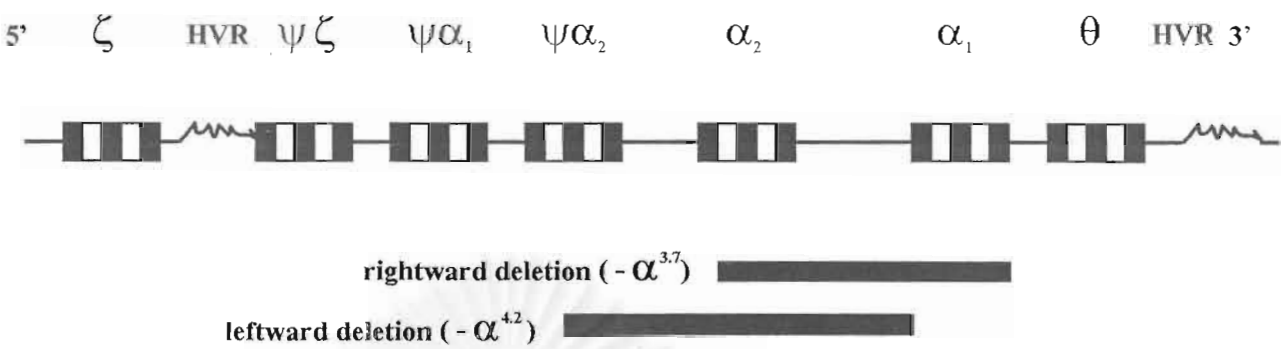
รูปที่ 2.17 แสดง α - thalassemia ชนิดต่างๆที่เกิดจากการขาดหายไปของ α - globin gene
แสดงบริเวณที่ยีนขาดไป แสดงบริเวณที่อาจจะมีการขาดของยีน แต่ยังขาดข้อมูลสนับสนุนเพียงพอ

α^0-Thalassemia โดยทั่วไปพบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเมดิเตอเรเนียน เชื่อได้ว่าα^0-Thalassemia แบบเฮทเตอโรไซโกตน่าจะมี selective advantage ต่อเชื้อมาเลเรีย *Plasmodium faciparum* Ifeddiba และคณะ (1985) ได้ศึกษาใน In Vitro ยังไม่มีความชัดเจน แต่ในเรื่องของการมี selective advantage พบว่าในคนที่เป็น HbH diseass (- - / -α) เชื้อมาเลเรียเจริญได้ช้ามากในเซลล์เม็ดเลือดแดง

ความสัมพันธ์ระหว่างการมีความถี่ของแอลฟาธาลัสซีเมียสูงกับการระบาดของมาเลเรียมีความเป็นไปได้เนื่องจากพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียมี selective advantage ทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อมาเลเรีย (Flint และคณะ, 1986) HbH diesease จะพบได้น้อยมากเป็นปรากฏการณ์ที่อธิบายได้ว่าในขณะที่ α^+-Thalassemia มีความถี่สูงขณะเดียวกัน α^0-Thalassemia ก็จะมีความถี่ต่ำในกลุ่มประชากร (Orkin และคณะ, 1979)

2. α - thalassemia 2 (α^+ – thalassemia) เกิดจากการที่ α structural gene (α_1 และ α_2) มีลำดับของเบสที่เหมือนกัน (homology sequence) อยู่ 3 แห่งคือ X , Y ,และ Z boxes ดังรูปที่ 2.16 เกิด misalignment และ crossing over ของดีเอ็นเอระหว่างโครโมโซม (reciprocal recombination) เกิดเป็นโครโมโซมที่มี single α gene (-α , α - thalassemia 2) และ triplicated α - globin gene ($\alpha\alpha\alpha$) เป็นเหตุให้มีการสร้าง α - globin chain น้อยกว่าปกติ α - thalassemia 2 แบ่งได้ออกเป็น 2 แบบ ตามตำแหน่งและขนาดของดีเอ็นเอที่ขาดหายไป ดังรูปที่ 2.18 คือ

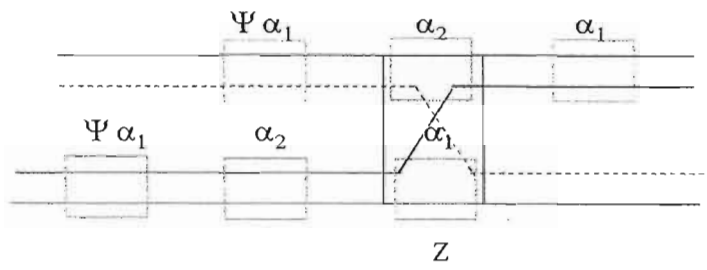
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



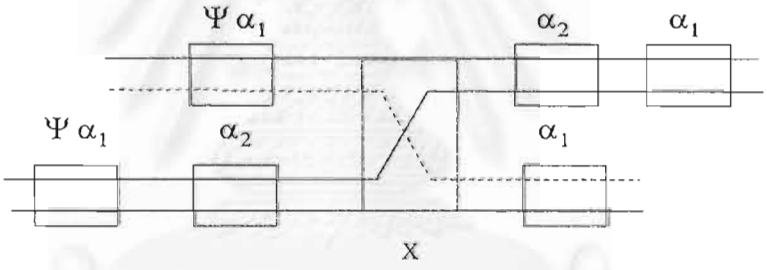
รูปที่ 2.18 แสดงการเรียงลำดับของยีนในกลุ่มแอลฟ่าโกลบินและขนาดของยีนที่ขาดหายไปแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$), leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) ที่พบในคนไทย

2.1 Leftward deletion type เกิด unequal crossing over ในบริเวณ X box ทำให้เนื้อดีเอ็นเอบริเวณ α_2 globin gene ขาดหายไป 4.2 กิโลเบส (- $\alpha^{4.2}$) จึงเหลือเพียง α_1 globin gene เท่านั้นที่สร้าง α - globin chain ได้ ดังรูปที่ 2.19

2.2 Rightward deletion type เกิด unequal crossing over ในบริเวณ Z box ทำให้เนื้อดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง α_1และ α_2 - globin gene ขาดหายไป 3.7 กิโลเบส (- $\alpha^{3.7}$) และ ดีเอ็นเอส่วนที่เหลือของ α_1และ α_2 - globin gene กลายเป็น hybrid gene ที่มี nucleotide sequence เช่นเดียวกับ α - globin gene โครโมโซมนั้นจึงยังคงมี α - globin gene เหลืออยู่ 1 อันซึ่งควบคุมการสร้าง α - globin chain ได้เช่นเดียวกันดังรูปที่ 2.20 α - thalassemia 2 ส่วนใหญ่เป็นชนิด Rightward deletion และพบชนิด Leftward deletion เป็นจำนวนน้อย



รูปที่ 2.19 แสดงการเกิด **unequal crossing over** ในบริเวณ Z - box เกิด α - thalassemia 2 ชนิด **rightward deletion** ทำให้เนื้อดีเอ็นเอของ α_1 และ α_2 ขาดหายไป 3.7 กิโลเบส ($-\alpha^{3.7}$)



รูปที่ 2.20 แสดงการเกิด **unequal crossing over** ในบริเวณ X - box เกิด α - thalassemia 2 ชนิด **leftward deletion** ทำให้ยีน α_2 ขาดหายไป 4.2 กิโลเบส ($-\alpha^{4.2}$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

rightward deletion และ leftward deletion พบว่ามีการกระจายอย่างสูงในเขตร้อน (tropical) และเขตค่อนข้างร้อน (subtropical) รวมทั้งในแอฟริกา, ชาวนิโกร , เมดิเตอเรเนี่ยน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเกาะบางเกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก โดยส่วนใหญ่จะเป็นชนิด rightward deletion พบว่าในประชากรปาปัวนิวกีนีพบชนิด leftward deletion สูง มาก (สุทัศน์ ฟู่เจริญ และปราณี ฟู่เจริญ ,2541) การมี α - thalassemia เกิดขึ้นสูงในชาว Saudi Oasis เชื่อว่าเป็นผลมาจาก 1) isolation 2) intense inbreeding 3) natural selection (Pembrey และคณะ, 1975) รวมถึงความถี่ยีนของ α^+ - thalassemia สูงยังไม่สามารถหาเหตุผลมาอธิบายได้โดยเฉพาะ (- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$)ที่พบได้โดยทั่วไปในโลกแต่ (- $\alpha^{4.2}$/ $\alpha\alpha$) พบได้เพียงบางพื้นที่ ซึ่งเชื่อว่าอาจเกิดจากกลไกของการเกิด crossover หรืออาจเป็นเพราะบริเวณ homology sequence ที่เกิด crossover ของ leftward deletion เป็นช่วงที่แคบ เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่เกิด crossover ของ rightward deletion (Trent และคณะ, 1981) หรืออาจเป็นไปได้ว่า (- $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$) มี selective advantage มากกว่า (Okin และ Goff, 1981) การที่ไม่ทราบระดับความรุนแรงของการระบาดของเชื้อมาลาเรียจึงไม่สามารถอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อย จึงไม่ทราบว่าความถี่สูงของยีนแอลฟาธาลัสซีเมียเกิดขึ้นได้อย่างไร การเกิด crossing over ของโครโมโซมบริเวณ α- globin gene อาจจะเกิดขึ้นกับ reproductive cell หรือช่วงใดช่วงหนึ่งของการแบ่งตัวแบบ meiosis จึงทำให้มีการส่งผ่านโครโมโซมที่มี single α- globin gene และ triplicated α - globin gene ต่อๆกันมา และด้วย selective pressure บางอย่าง ซึ่งขณะนี้เชื่อว่าเกิดจากการติดเชื้อมาเลเรีย ทำให้พบว่ามีอุบัติการของ α - thalassemia 2 สูงถึงร้อยละ 80-90 ในประชากรบางกลุ่มที่มีปัญหาของโรคมาเลเรียสูง ในขณะที่ตรวจพบโครโมโซมที่มี triplicated α - globin gene ต่ำมาก เพราะไม่มี selective advantage ต่อการเป็นโรคมาเลเรีย โดยทั่วไปผู้ที่มียีน α ขาดหายไป 1 ยีนเป็น α - thalassemia 2 trait, - α / $\alpha\alpha$) หรือผู้ที่มียีน α ขาดหายไป 2 ยีนเป็น α - thalassemia 1 trait, - - / $\alpha\alpha$) จะเหมือนคนปกติคือไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย แต่อาจตรวจพบเม็ดเลือดแดงขนาดเล็กลงและมีรูปร่างผิดปกติบ้างเล็กน้อยในผู้ที่เป็น α - thalassemia 1 trait

Tsintsof และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาในประเทศออสเตรเลียพบชนิดของ α^+- thalassemia เป็นแบบ rigthward deletion (- $\alpha^{3.7}$)

Novelletto และคณะ (1989) ได้ศึกษาความถี่ของการขาดหายไปของ α- globin gene ในประเทศอียิปต์พบความถี่ของการขาดหายไปของยีน α- globin 0.08 โดยพบชนิด - $\alpha^{3.7}$ type I เป็นส่วนมาก - $\alpha^{4.2}$ พบความถี่ต่ำมาก และไม่พบ α^{0} - thalassemia เลย

Embury และคณะ (1980) ได้ศึกษาหาความถี่ของ α^{+}- thalassemia ทั้งสองชนิด โดยสามารถที่จะพบ rigthward deletion ในคนนิโกร , เมดิเตอเรเนี่ยน และชาวจีนเป็นส่วนใหญ่ แต่พบ leftward deletion ได้เพียงบางส่วน

Pirastu และคณะ (1982) ได้ทำการศึกษาในประชากร 2 กลุ่ม ในแถบเมดิเตอร์เรเนียนโดยกลุ่มแรกทำการศึกษาใน Greek Cyproits จำนวน 50 ตัวอย่างและ Sardinian จำนวน 69 ตัวอย่าง พบชนิด rightward deletion ทั้งหมดคิดเป็นความถี่ 0.18 และ 0.07 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (-$\alpha^{4.2}$) โดยวิธี Southern blot

เป็นเทคนิคที่พัฒนาโดย E.M. Southern โดยมีหลักการดังนี้วิธีนี้ทำการตรวจหาดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพื่อที่จะให้ได้ท่อนดีเอ็นเอ (DNA fragments) จำนวนมากแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาด โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส ท่อนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะวิ่งในสนามไฟฟ้าช้ากว่าท่อนเล็ก หลังจากนั้นก็นำเจลที่ได้จากการทำ อิเลคโตรโฟรีซีส ไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วส่องดูด้วยรังสี ultraviolet ก็จะสามารถทราบขนาดของดีเอ็นเอจากตำแหน่งท่อนดีเอ็นเอนั้นๆเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นมาตรฐาน จากนั้นก็ทำให้ดีเอ็นเอซึ่งเป็นเส้นคู่แยกออกเป็นเส้นเดี่ยว แล้วย้ายดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวไปยังแผ่น nylon membrane โดยวิธี Southern blot ซึ่งอาศัยหลักการ capillary action โดยสารละลายจากด้านล่างของเจลจะซึมผ่านเจล และแผ่น nylon membrane ไปยังส่วนของกระดาษกรองที่แห้ง การซึมผ่านของสารละลายจะพาเอาดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวจากเจลไปจับที่แผ่น nylon membrane โดยมีตำแหน่งเหมือนกับที่อยู่บนเจล เมื่อนำแผ่น nylon membrane นี้ไปทำปฏิกริยาไฮบริไดเซชั่น กับดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากด้วยรังสีหรือสารเคมีที่ทำให้เกิดแถบสี ส่วนของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอติดตามก็จะจับกับดีเอ็นเอติดตามนั้นทำให้เมื่อนำไปประกบกับแผ่น X - ray film จะเห็นเป็นแถบสีดำที่บริเวณนั้น

ข้อดี สามารถบอกรายละเอียดโดยสามารถบอกตำแหน่งของดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆและบอกขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการได้

Yenchitsomanus และคณะ (1985) ได้ศึกษาความถี่ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในแมร์แดง (Madang) บนเกาะคาร์ คาร์ ทำการศึกษาโดยวิธี Southern blotโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ B*am*H I และ B*gl* II ในการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอ ติดตามด้วย ^{32} P ติดฉลาก α - globin gene

Rienzo และคณะ (1988) ได้ศึกษา α^{+} - thalassemia ในประเทศอิตาลีจากกลุ่มตัวอย่าง 48 ราย จีโนมิคดีเอ็นเอ ถูกตัดด้วยเอนไซม์ B*am*HI, A*pa* I และ R*sa* I ใช้อะกาโรสเจล 0.8% ถ่ายดีเอ็นเอลง ในแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose filter) ติดตามด้วย radioactive α - genomic probe

Huang และคณะ (1988) ได้ศึกษาจีโนไทป์ของแอลฟาธาลัสซีเมียในประเทศจีน ในคนปกติถ้าดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ B*am*HI จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 14 กิโลเบสส่วนในคนที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (-$\alpha^{4.2}$) จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 10.3 กิโลเบส และ 9.8 กิโลเบส ตามลำดับแต่ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งสองนี้มีขนาดใกล้เคียงกันมากจึงใช้เอ็นไซม์ B*gl* II ตัดจีโนมิคดีเอ็นเอในตัวอย่างเดิมอีกครั้ง ในคนปรกติจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 12 กิโลเบส และ 7.4 กิโลเบส ตามลำดับ ทำการศึกษาโดยใช้ 0.8% อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ถ่ายดีเอ็นเอลงในไนโตเซลลูโลสติดตามด้วยดีเอ็นเอที่ติดลากด้วย ^{32}P - labeled α - globin gene probe

Kulozik และคณะ (1988) ได้ศึกษายีนแอลฟาธาลัสซีเมียในชาวเมืองโอริสา (Orissa) ประเทศอินเดีย โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ B*am* HI และ B*gl* II ติดตามดีเอ็นเอด้วย ^{32}P labeled genomic P*st* I α และ B*am*HI/E*co*RI ζ Fragment probe

Sanchisuriya และคณะ (1997) ได้ศึกษาฮีโมโกลบินผิดปรกติ คือ HbE เฮทเทอโรไซโกต ร่วมกับการตรวจสอบแอลฟาธาลัสซีเมีย โดยα^+ - thalassemia ตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot ใช้ B*am* HI และ B*gl* II ในการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอ ติดตามด้วย α /p*st* I ใน pUC 9 α -globin gene probe (Winichagoon และคณะ, 1984) ติดฉลากด้วย nonradioactive กับ steroid haptene digoxigenin ติดตามดีเอ็นเอและตรวจสอบผลโดยใช้ digoxigenin hybridized signal ตามวิธี Boeringer Mannheim, Germany

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	รุ่นและชื่อบริษัท
DNA thermocycler 9600	Perkin Elmer Cetus USA.
Microtube ขนาด 0.25 มล. , ขนาด 1.5 มล.	Treff Switzerland
Autopipette ขนาด 0.5 – 10 ไมโครลิตร	Biorad
ขนาด 10 – 100 ไมโครลิตร	Edpeddrof
ขนาด 20 – 200 ไมโครลิตร	Edpeddrof
Pipette tip	SARSTEDT No. 500700 / 760002 W Germany
Microcentrifuge	202 , Sigma
Horizontal minigel electrophoresis apparatus	Mupid , Japan
Microwave oven	Sharp
UV transilluminator	Model TM – 36 UVP, USA.
Gel Documentary and Analysis System , Gel Doc 1000	Biorad
Electrophoresis power Supply – Eps 600	Gelman Sciences
Power supply	Gelman instrument Company;model 38207 , USA
Cellulose acetate electrophoresis strips	Sepraphore111, Gelman
Sample applicator	Gelman instrument Company , USA
Waterbath	Grint Instrument No. 028739041 England
Vortex mixer	Scientific Industries No. 37605,USA
Deluxe Electrophoresis Chamber	Gelman Sciences Inc. USA

อุปกรณ์

ถาดสแตนเลทสี่เหลี่ยม
กระจกสี่เหลี่ยม
กล่องพลาสติกขนาดเล็ก 4″ X 8″
Nylon membrane
กระดาษ 3 MM
บีกเกอร์
ถุงมือ
Parafilm
กระดาษหนังสือพิมพ์

สารเคมี

ชื่อสารเคมี	ชื่อบริษัท
Dextran average M.W. 162,000	Sigma
Sodium chloride (NaCl) M.W. 58.443 Ar. Grade Carlo	Merck
Ethylenediamine tetra acetic acid disodium salt dihydrate ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_6$) M.W. 372.24	Fluka AG.
Bromophenol blue	Sigma
Absolute ethanol (C_2H_5OH) 99.8 % assay	Carlo Erba.
Acetic acid (CH_3COOH) 99.97 %assay	Baker Analyzed
Agarose gel Type II Medium EEO	Sigma
Ammonium Chloride (NH_4Cl) M.W. 58.492 AR grade	Carlo Erba
Carbontetrachloride (CCl_4) AR grade	Carlo Erba
dNTP (dATP , dGTP , dCTP , dTTP)	Promega
Ethidium bromide E – 7637 M.w. : 394.3	Sigma
Potassium chloride (KCl) M.w. 74.56 GR grade	Merck
Glycerol ACS for Analysis	Carlo Erba
Xylene Cyanol FF M.W. 583.6	Sigma

Gelatin Type B	Sigma
Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2.6H_2O$) M.W. 203.81	Fluka
B – buffer	Promega, USA
10 x Ava II buffer	Promega, USA
Sodium dodecyl Sulphate (SDS)	Sigma
Tris – chloride	Sigma
Tris – base	Sigma
Boric acid	Sigma
Ponceau S	Sigma
Trichloro acetic acid	Sigma

เอ็นไซม์

Pronase E	Promega, USA
Taq DNA polymerase	Promega, USA
B*gl* II	Promega, USA
E*co*R I	Promega, USA
P*st* I	Promega, USA
A*va* II	Promega, USA
B*am* H I	Promega, USA
H*in*c II	Promega, USA
H*in*d III	Promega, USA

ชุดเครื่องมือสำเร็จรูป (Kit)

Digoxigenin	Boeringer Mannhein CO.
Digoxigenin Labelling and detection Kit	Boeringer Mannhein CO.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (Oligonucleotide primer)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
SF7	GGCACATGGATCGAATTGA
SF8	ACCATGTGCCAGGCCTGAG
SF3	GTTTGTGTGTGTGTGAGAGC
SF4	TCTTTAGGCATGCGTCAACA
SF5	TTAACGTCTTCAGCCTACAA
SF6	CAATCTGCACACTTGAGGGGC
SF9	GGGAACATAATTTTGTGTGT
SF10	CCTCTTTTCTTGCAGGATTGC
SF11	GCTCCATGAACAAACATTCC
SF12	AAGGAGCACCCACTAGCTCA
YK15	TCTCTCTGCCTATTGGTCTA
G8	GCTTGGACTCAGAATAATCC
SF1	GCCCACATCACCAAGGCAAT
SF2	GCTCTACGGATGTGTGAGAT
A7	CTCTGGTTCTCAGTTGGAG
A9	ATATATTGGGTCTGAAGTGTATC
A1B	GGTCCCTGAGCCCGACGACG

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิธีดำเนินการศึกษา

ขั้นตอนในการศึกษา

4.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรชาวน้ำ

4.2 การเตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน (hemolysate)

4.3 การศึกษาชนิดฮีโมโกลบินโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis ; hemoglobin electrophoresis

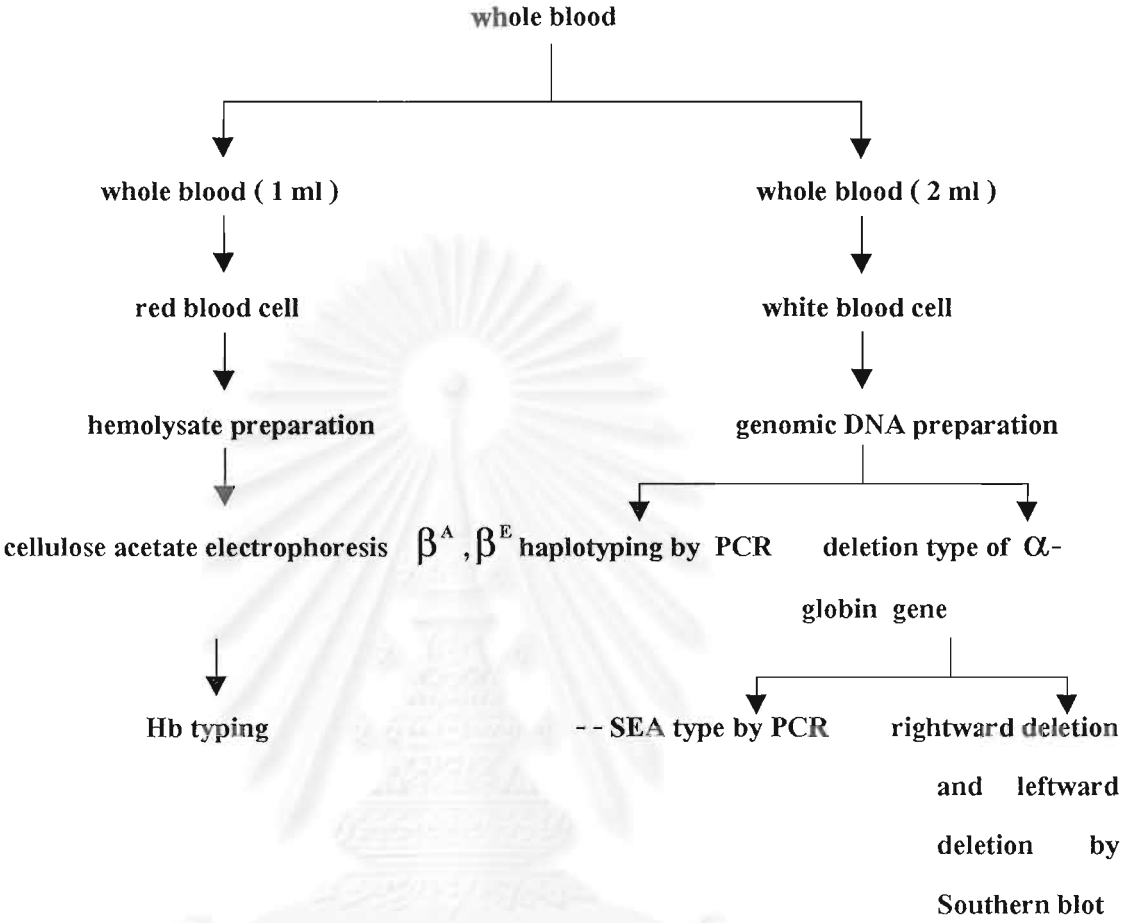
4.4 การเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ

4.5 ศึกษา DNA restriction polymorphism หรือลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β - globin gene haplotypes) โดยวิธีพีซีอาร์

4.6 ศึกษารูปแบบการขาดหายไป (gene deletion type) ของยีนแอลฟาโกลบิน ชนิด Southeast Asia type (- - SEA) หรือ α^0- thalassemia โดยวิธีพีซีอาร์

4.6 การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) หรือ α^+- thalassemia ด้วยวิธี Southern blot hybridization

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรชาวน้ำ

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาได้จากชาวน้ำ 2 กลุ่มโดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำรายละ 3 มล.ใส่ในขวดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัวชาวน้ำ 2 กลุ่มที่ทำการศึกษาคือ

- ชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชย ตำบลไม้ขาว อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต จำนวน 64 ราย
- ชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ ตำบลรัษฎา อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต จำนวน 65 ราย

นำเลือดที่ได้มาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นโดยแบ่งตัวอย่างเลือดออกเป็น 2 ส่วน คือ 1 มล.กับ 2 มล. นำไปศึกษาดังนี้

4.2 การเตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน

4.2.1 นำเลือดส่วน 1 มล.มา 0.5 มล.ใส่ใน microtube ขนาด 1.5 มล.มาเติม 0.85 % NaCl โดยใช้ปริมาตรสารละลาย NaCl มากกว่าเม็ดเลือดแดงประมาณ 10 เท่า

4.2.2 ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

4.2.3 ดูดน้ำส่วนบนทิ้งไปแล้วทำตามข้อ 4.2.1 – 4.2.3 ซ้ำ 3 ครั้ง

4.2.4 เติมน้ำกลั่น 1 เท่าของปริมาณเม็ดเลือดแดงผสมกันโดยใช้ vortex mixer เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก

4.2.5 เติม CCl_4 ในปริมาณครึ่งหนึ่งของสารละลายฮีโมโกลบินผสมกันโดยใช้ vortex mixer

4.2.6 นำสารละลายไปปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นน้ำละลายฮีโมโกลบินใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มล. เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธีเซลลูโลสอะซีเตทอิเลคโตรโฟเรซีส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาชนิดฮีโมโกลบินโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis ; Hemoglobin electrophoresis

4.3.1 แช่แผ่น cellulose (TITAN III-H cat.NO.3002)(Mylar) ใน Tris-EDTA-borate buffer pH 8.6 นาน 5 นาที

4.3.2 ซับ buffer ที่มากเกินพอออกจากแผ่น cellulose ด้วยกระดาษกรอง

4.3.3 หยดสารละลายฮีโมโกลบินหยดละ 12.5ไมโครลิตร ลงบนแผ่น cellulose acetate ด้วยอุปกรณ์หยดสารละลายฮีโมโกลบิน (sample applicator cat. NO. 4084) ให้ห่างจากปลายด้านหนึ่งประมาณ 1.5 นิ้ว

4.3.4 ขึงแผ่น cellulose acetate ในกล่องใส่บัฟเฟอร์ตัวนำไฟฟ้าให้ปลายด้านที่มีน้ำละลายฮีโมโกลบินอยู่ทางด้านขั้วลบปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปโดยให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 350 โวลต์ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 30 นาทีหรือจนกว่าจะเห็นแถบฮีโมโกลบินแยกกันชัดเจน

4.3.5 นำแผ่น cellulose acetate ที่แยกชนิดของฮีโมโกลบินเสร็จแล้วมาย้อมด้วยสี ponceau S นาน 5 นาที

4.3.6 เก็บแผ่น cellulose acetate ใส่ในถุงพลาสติก แล้วนำมาอ่านผล

4.4 การเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ

4.4.1 เติมเลือด (whole blood) ส่วนที่เหลือ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มล.

4.4.2 เติม 3% dextran ลงไป 1 เท่าของปริมาณเลือดผสมเบาๆให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4.4.3 ดูดน้ำส่วนบนใส่ลงใน microtube ขนาด 1.5 มล.

4.4.5 ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

4.4.6 เทน้ำส่วนบนทิ้งเติม lysis buffer 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.4.7 ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

4.4.8 เทน้ำส่วนบนทิ้งผสมตะกอนให้เข้ากันตามเดิม

4.4.9 เติม SE buffer 300 ไมโครลิตร, 20% SDS 15 ไมโครลิตร, pronase E (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร

4.4.10 ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะย่อยหมด

4.4.11 เติม 6 โมลาร์ NaCl 85 ไมโครลิตร ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

4.4.12 ดูดน้ำส่วนบนใส่ลงใน microtube 400ไมโครลิตร

4.4.13 เติม absolute ethanol (cold 800 ไมโครลิตร) ผสมเบาๆ

4.4.14 ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

4.4.15 ดูด absolute ethanol ทิ้งไปเติม 70% ethanol 100 ไมโครลิตร

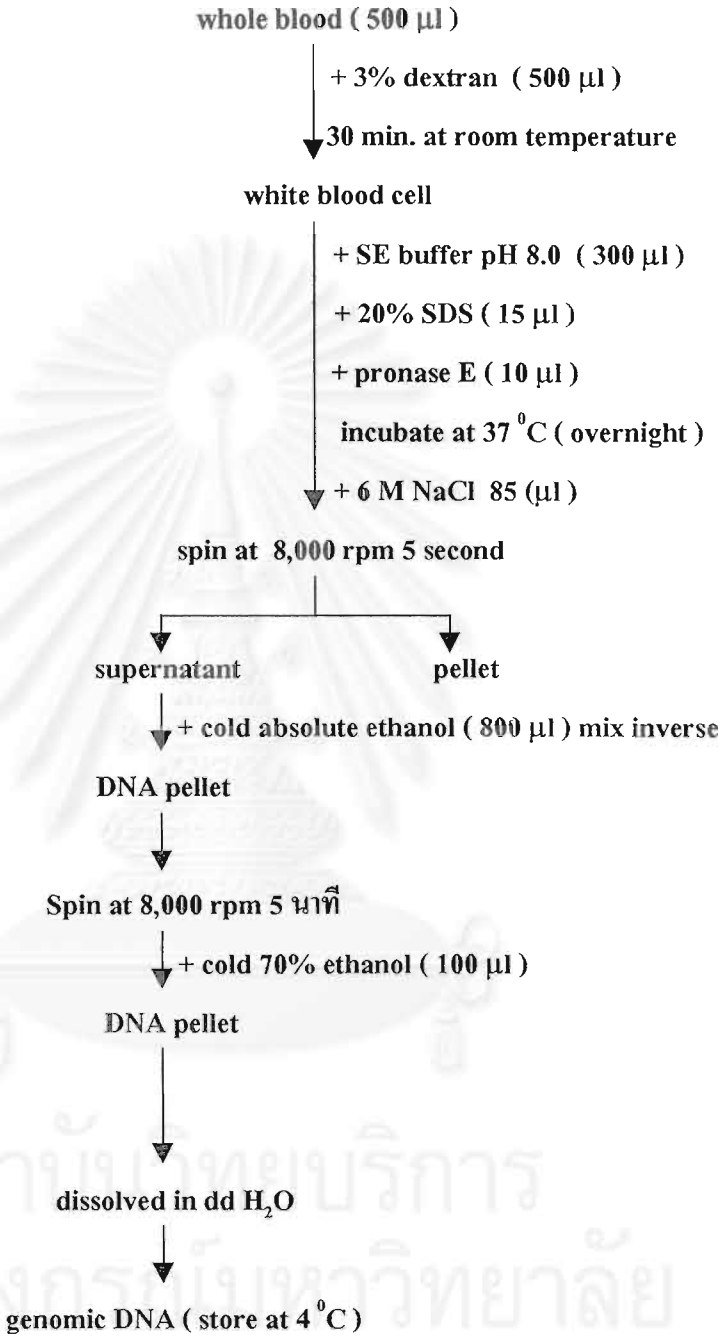
4.4.16 ดูด 70% ethanol ขึ้นลงเพื่อล้างดีเอ็นเอแล้วดูด 70 % ethanol ทิ้งไป

4.4.17 นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

4.4.18 เติมน้ำปราศจากอิออน (sterile deionized water) 100 – 200 ไมโครลิตร

4.4.19 ละลายดีเอ็นเอให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเตรียมจีโนมิคดีเอ็นเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากได้จีโนมิคดีเอ็นเอแล้วนำมาศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินโดยวิธีพีซีอาร์

4.5 ศึกษา DNA polymorphism หรือลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene haplotypes) โดยวิธีพีซีอาร์

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตำแหน่งโพลีมอร์ฟิคเรสติกชั้นไซท์ (polymorphic restriction sites) ภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบินจำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 1 5' ε- *Hinc* II ตำแหน่งที่ 2 $^{G}\gamma$ - *Hind* III ตำแหน่งที่ 3 $^{A}\gamma$ - *Hind* III ตำแหน่งที่ 4 ψβ-*Hinc* II ตำแหน่งที่ 5 3' ψβ- *Hinc* II ตำแหน่งที่ 6 β -A*va* II และตำแหน่งที่ 7 3' β–*Bam*HI
(Fukumaki และ Fucharoen, 1991) ดังรูปที่ 4.4

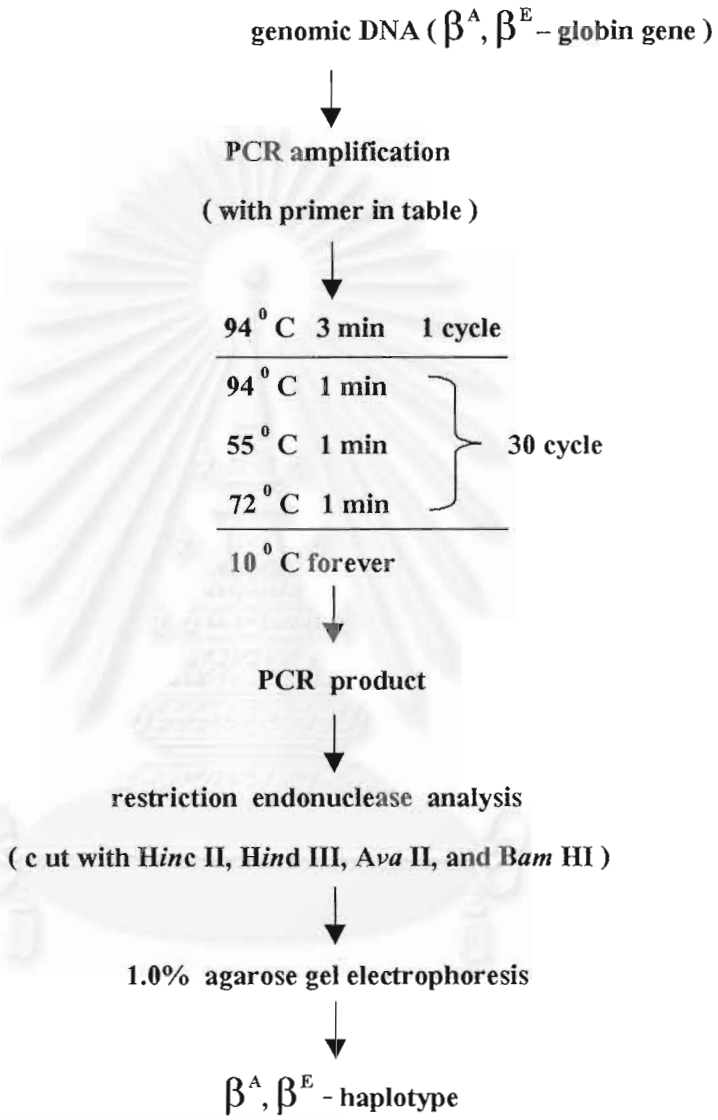
ขั้นตอนในการศึกษา มีดังนี้

1.ทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งที่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้วิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมซึ่งแสดงไว้ดังรูปที่ 4.1

2. เมื่อได้ดีเอ็นเอที่ได้จาก ข้อ 1 ก็ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restrition endonuclease) ทำการตัด โดยดูผลจากการตัดได้ (presence, +) หรือตัดไม่ได้ (absence, -) ของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

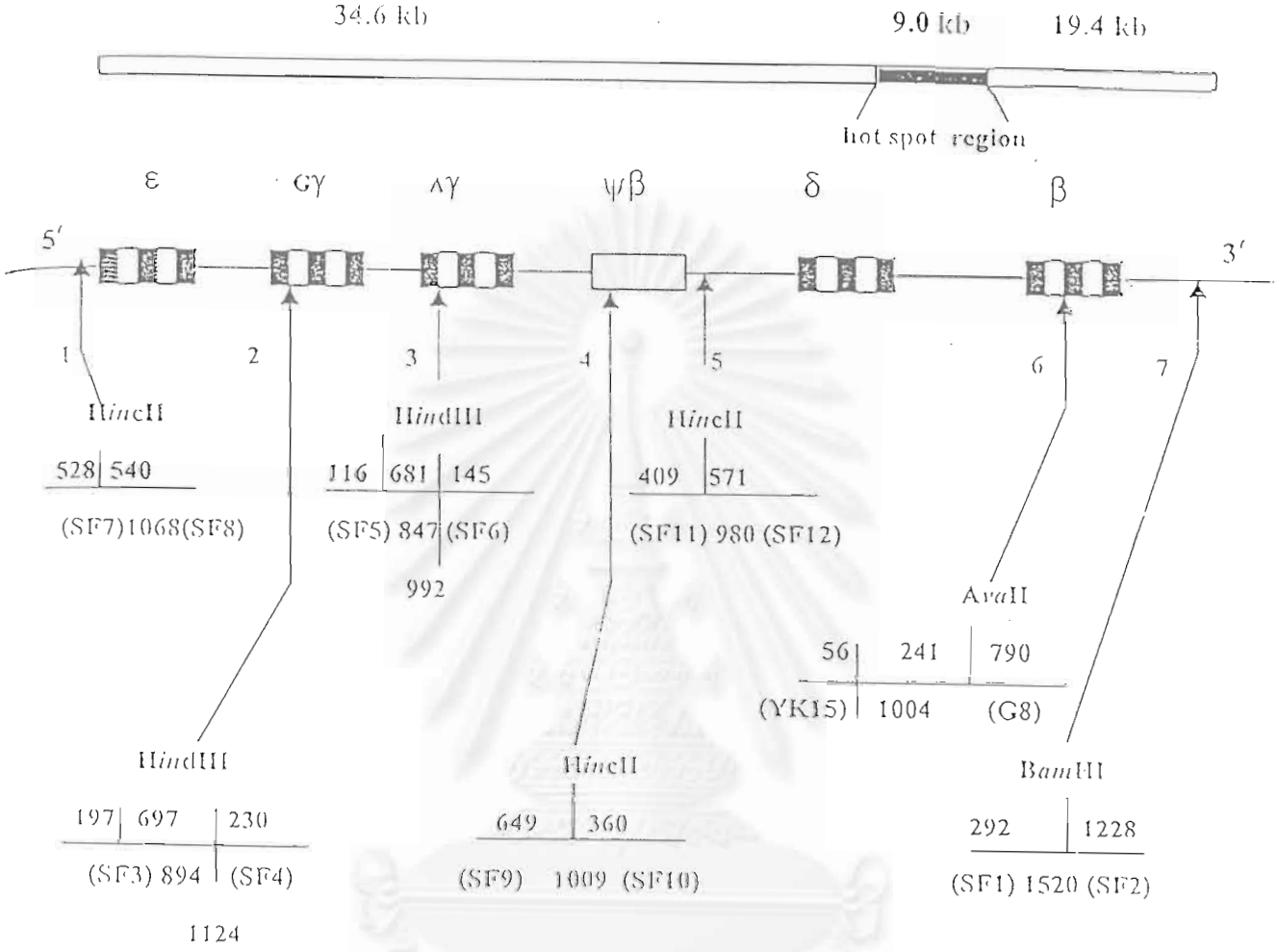
3. ตรวจสอบผลการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้ เจลอิเลคโตรโฟเรซีสในการตรวจผล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.3 แสดงขั้นตอนในการศึกษา DNA polymorphism หรือลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β-globin gene haplotypes) โดยวิธีพีซีอาร์



รูปที่ 4.4 แสดงตำแหน่งของ DNA restriction polymorphism ภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบินที่ประกอบด้วย 7 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1 5' ε- *Hinc* II ตำแหน่งที่ 2 $^{G}\gamma$-*Hind* III ตำแหน่งที่ 3 $^{A}\gamma$-*Hind* III ตำแหน่งที่ 4 ψβ -*Hinc* II ตำแหน่งที่ 5 3' ψβ -*Hinc* II ตำแหน่งที่ 6 β-*Ava* II และตำแหน่งที่ 7 3' β -B*am*HI โดยใช้วิธีพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง และอาศัยไพร์เมอร์และเอ็นไซม์ที่ตัดจำเพาะต่อตำแหน่งนั้นๆ (Fumakuki และ Fucharoen, 1991) ยกตัวอย่างเช่นตำแหน่งที่ 1, 5' ε-Hinc II หมายถึงบริเวณจากส่วน 5' จนถึงส่วนของยีน ε-globin gene ซึ่งจะถูกเพิ่มดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นโดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะต่อ ตำแหน่งนั้นคือ SF 7 และ SF 8 จะทำให้ได้ขนาดดีเอ็นเอ 1068 bp เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hinc* II จะทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 540 คู่เบส และ 528 คู่เบส รายละเอียดของไพร์เมอร์ต่างๆ แสดงไว้ ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์และตำแหน่งของยีนภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบินที่ใช้ในการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอ-โกลบินและยีนบีตาอี -โกลบิน

ชนิดไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' → 3'	โพลีมอร์ฟิกไซท์	ยีน
[1]SF7	GGCACATGGATCGAATTGA	Hind III	5' ε
[2]SF8	ACCATGTGCCAGGCCTGAG		
[1]SF3	GTTTGTGTGTGTGTGAGAGC	Hind III	$^{G}\gamma$
[2]SF4	TCTTTAGGCATGCGTCAACA		
[1]SF5	TTAACGTCTTCAGCCTACAA	Hind III	$^{A}\gamma$
[2]SF6	CAATCTGCACACTTGAGGGGC		
[1]SF9	GGGAACATAATTTTGTGTGT	Hinc II	ψβ
[2]SF10	CCTCTTTTCTTGCAGGATTGC		
[1]SF11	GCTCCATGAACAAACATTCC	Hinc II	3' ψβ
[2]SF12	AAGGAGCACCCACTAGCTCA		
[1]YK15	TCTCTCTGCCTATTGGTCTA	Ava II	β
[2]Q8	GCTTGGACTCAGAATAATCC		
[1]SF1	GCCCACATCACCAAGGCAAT	BamH I	3' β
[2]SF2	GCTCTACGGATGTGTGAGAT		

1 = upstream primers

2 = downstream primers

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้นำมาศึกษาต่อโดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายในกลุ่มยีนบีตาเอ-โกลบิน และ กลุ่มยีนบีตาอี-โกลบิน ด้วยวิธีพีซีอาร์ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมหลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.25 มล. ใส่ ดีเอ็นเอตัวอย่าง 1ไมโครลิตรและเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

10Xbuffer Mg Free	2.5	ไมโครลิตร
25 มิลลิโมลาร์$MgCl_2$	2.5	ไมโครลิตร
dNTPs	1	ไมโครลิตร
upstream primers *	1	ไมโครลิตร
downstream primers *	1	ไมโครลิตร
deionized water	15	ไมโครลิตร
Taq polymerase	1	ไมโครลิตร

* รายละเอียดของไพรเมอร์แสดงไว้ในตารางที่ 4.1

2. เริ่มทำพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle 9600 Program 125 โดยใช้อุณหภูมิและเวลาตามลำดับดังนี้ยกเว้นตำแหน่ง $^{G}\gamma$ ที่จะต้องใช้โปรแกรม 7 และ 14 ตามลำดับ ซึ่งโปรแกรมนี้ต้องใช้เครื่อง DNA thermal cycle 480 (รายละเอียดของโปรแกรมจะแสดงไว้ที่ภาคผนวก)

94 ^{0}C	3 min	1 cycle
94 ^{0}C	1 min	30 cycle
55 ^{0}C	1 min	
72 ^{0}C	1 min	
10 ^{0}C	forever	

3. นำ ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มา 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร ไปตรวจดูโดยการทำ agarose gel electrophoresis (1%) เทียบกับ λ/Hind III และย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เป็นผลสำเร็จจะปรากฏเป็นแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆตามชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ให้เห็น

เมื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วนำมาวิเคราะห์ต่อ

วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธีการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme analysis of amplified DNA) ทำตามขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมหลอด microtube ขนาด 1.5 มล.ใส่ amplified DNA ตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร และเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

10 X enzyme buffer	1.5	ไมโครลิตร
100 มิลลิโมลาร์ spermidine	0.1	ไมโครลิตร
distilled water	3.2	ไมโครลิตร
restriction endonuclease	0.1	ไมโครลิตร

รายละเอียดของเรสตริกชั่นเอ็นไซม์และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมแสดงไว้ในตารางที่ 4.2

2. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสovernight

3. นำดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์มา 7.5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1.5 ไมโครลิตร ไปตรวจดูโดยการทำ agarose gel electrophoresis (1%) เทียบกับ λ/Hind III 1.5 µl และ control (ดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์)

4. จากนั้นย้อมดีเอ็นเอที่ตัดได้หรือตัดไม่ได้ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วถ่ายรูปเจลที่ได้แล้วนำมาอ่านผล

ตารางที่ 4.2 แสดงเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและบัฟเฟอร์ที่ใช้

ชนิดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	บัฟเฟอร์
*Hinc*II	B-buffer
*Hind*II	B-buffer
*Ava*II	A*va*II – buffer
*Bam*HI	E-buffer

วิธีการทำ agarose gel electrophoresis ประกอบไปด้วยขั้นตอนดังนี้

1. คำนวณ agarose ปริมาณที่ต้องการ เช่น agarose gel 1% ให้ชั่ง agarose 1 กรัม ใส่ขวดที่มีฝาเกลียวเติมบัฟเฟอร์ 1 X TAE 100 มล. คนและตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที เพื่อให้ agarose ซึมซับน้ำ ซึ่งจะช่วยลดฟองอากาศที่จะเกิดขึ้นระหว่างการต้ม ปิดฝาเกลียวโดยคลายเกลียวให้หลวม ต้ม agarose ในเครื่องไมโครเวฟ ประมาณ 3-4 นาที จนละลายตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นลงประมาณ 65 องศาเซลเซียส

* ระวังอย่าแกว่งสารละลาย agarose เมื่อต้มเดือดใหม่ๆ เพราะเจล solution อาจจะเดือดพุ่งออกมาจากขวดและเป็นอันตราย

2. เทสารละลาย agarose ลงบนแผ่นกระจกที่ได้เตรียมไว้โดยมีหวี (comb) เสียบอยู่ในแนวตั้งฉากกับแผ่นกระจกให้เจล มีความหนาประมาณ 0.3-0.5 ซม. และให้ปลายซี่หวีสูงจากแผ่นกระจกประมาณ 2 ม.ม. รอจนเจลแข็งตัวดีแล้ว (ประมาณ 10 นาที) จึงดึงหวีออกโดยการดึงหวีขึ้นตรงๆอย่าขยับไปมาเพราะอาจทำให้ขอบหลุมไม่เรียบ

3. นำเจลที่แข็งแล้วนี้ไปวางใน chamber สำหรับทำ electrophoresis โดยให้ด้านที่เป็นหลุมของเจลอยู่ทางด้านขั้วลบของ chamber หรือเก็บแช่ในบัฟเฟอร์ในกล่องที่มีฝาปิดได้นาน 1-7 วัน

4. เทสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปพอท่วมบนผิวหน้าของเจล และไหลลงไปในหลุมที่จะหยอดดีเอ็นเอระวังอย่าเติม บัฟเฟอร์ให้ท่วมผิวหน้าของเจลมากเกินไป เพราะจะทำให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลน้อยลง และใช้เวลามากขึ้นในการแยก DNA fragment

5. ดูดสารละลาย ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการทดสอบหรือ ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำพีซีอาร์มาผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 5:1 บนแผ่น parafilm แล้วหยอดลงหลุม ของเจลที่อยู่ใต้สารละลายบัฟเฟอร์ ให้ครบตามจำนวนทั้งหมด พร้อมทั้ง หยอด DNA size marker และ control ในหลุมใดหลุมหนึ่งเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของ ดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์

6. ต่อวงจรกระแสไฟฟ้าตรงเข้ากับ chamber ให้ด้านที่มี ดีเอ็นเอตัวอย่างอยู่ทางขั้วลบ ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ตามที่เราต้องการ ให้ ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปประมาณ 2/3 ของแผ่นเจล

7. ปิดกระแสไฟฟ้า และตักเจลขึ้นมาใส่ในถาดย้อมที่มีสารละลาย ethidium bromide ที่ความเข้ม ข้น (0.5 มก./มล.) ประมาณ 10 นาที และตักเจลออกมาล้างในน้ำกลั่นประมาณ 2 นาที

8. ตรวจดูแถบของ ดีเอ็นเอโดยการดูการเรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet ที่มีช่วงคลื่นประมาณ 260-360 นาโนมิเตอร์

9. ถ่ายภาพ ดีเอ็นเอเพื่อเก็บเป็นบันทึกถาวร ใน gel documentary and analytical system, Gel DOG 1000 (Biorad)

4.6 การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟ่าโกลบินชนิด Southeast Asia type (- - SEA) หรือ α^0- thalassemia โดยวิธีพีซีอาร์

Southeast Asia type (- - SEA) เกิดจากการขาดหายไปของ ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ซึ่งรวมเอายีน α_1 และ α_2 บน α - globin gene cluster การตรวจหายีนผิดปกติโดยวิธีพีซีอาร์ ทำโดยใช้ primer 3 ชนิดดังตารางที่ 4.3 ซึ่งจะเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอ 2 ชนิดที่มีขนาดแตกต่างกันโดย primer A7 และ A9 ซึ่งคร่อมบริเวณที่มีรูปแบบการขาดหายไปของยีน α - globin ชนิด - - SEA จะให้ PCR product ที่มีแถบ ดีเอ็นเอ ขนาด 660 คู่เบส ส่วน primer A7 และ A1B จะให้ PCR product ที่มีขนาด 314 คู่เบสจาก ดีเอ็นเอ ที่มียีนปกติ

ตารางที่ 4.3 แสดงชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในปฏิกริยาพีซีอาร์

ชนิด primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' → 3'
A7	CTCTGTGTTCTCAGTATTGGAG
A1B	GGTCCCTGAGCCCGACGACG
A9	ATATATTGGGTCTGAAGTGTATC

ขั้นตอนการตรวจหารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟ่าโกลบินชนิด Southeast Asian type (- - SEA) หรือ α^0- thalassemia โดยวิธีพีซีอาร์

1. เตรียม microtube ขนาด 0.25 มล.ใส่ ดีเอ็นเอ ตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร และเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

sterile deionized distill H_2O	11	ไมโครลิตร
10X Taq buffer	2.5	ไมโครลิตร
dNTPs mixtures	1	ไมโครลิตร
50 % glycerol	5	ไมโครลิตร
primer A7 15 (พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	0.7	ไมโครลิตร
primer A9 15 (พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1.7	ไมโครลิตร
primer A1B 15 (พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1.5	ไมโครลิตร
Taq Polymerase (1ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร

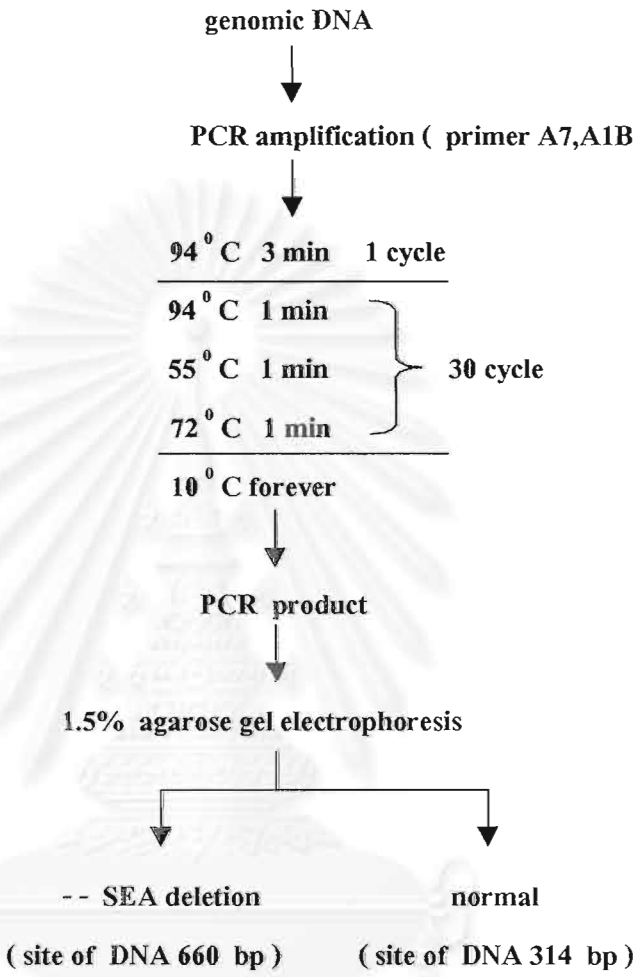
ผสมให้เข้ากันปั่นให้สารละลายลงสู่ก้นหลอด

2. นำไปใส่เครื่อง DNA Thermal Cycle 9600 โดยใช้อุณหภูมิและเวลาตามลำดับดังนี้

94 ^{0}C	3 min	1 cycle
94 ^{0}C	1 min	30 cycle
55 ^{0}C	1 min	
72 ^{0}C	1 min	
10 ^{0}C	forever	

3. ตรวจดู PCR product บน agarose gel electrophoresis 1.5 % เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอ size marker (λ/ *Hind* III) และ control ซึ่งเป็นตัวอย่าง ดีเอ็นเอ ที่มีรูปแบบการขาดหายไปของยีน α - globin ชนิด - - SEA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



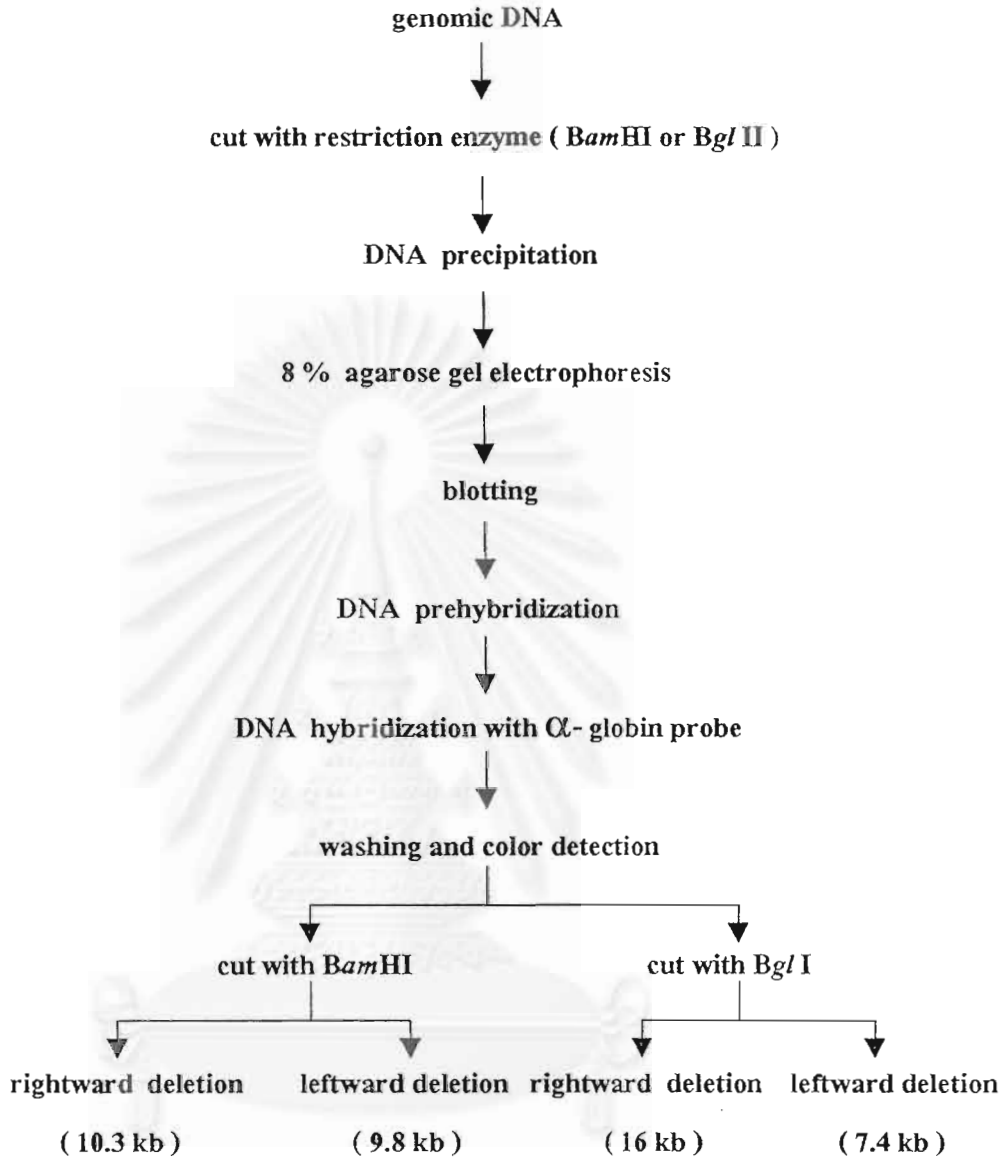
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.5 รูปแผนภูมิแสดงขั้นตอนในการตรวจสอบ Southeast Asian type (- - SEA) หรือ α^0-thalassemia โดยวิธีพีซีอาร์

4.7 การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) หรือ α^{+}- thalassemia ด้วยวิธี Southern blot hybridization

ในการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินทั้ง 2 แบบนี้ทำได้โดยการนำจีโนมิค ดีเอ็นเอ ที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ B*am* HI ในคนปกติจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 14 กิโลเบส ส่วนในคนที่มีการขาดหายไปแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) จะได้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ขนาด 10.3 กิโลเบส และ 9.8 กิโลเบส ตามลำดับ ซึ่งขนาด ดีเอ็นเอ ทั้ง 2 มีขนาดใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถที่จะแยกได้อย่างชัดเจน เราจึงใช้เอ็นไซม์ B*gl* II ตัดจีโนมิค ดีเอ็นเอ ในตัวอย่างเดิมอีกครั้ง แล้วตามด้วยการทำ Southern blot hybridization ตามวิธี Boeringer Mannheim , Germany ซึ่งในคนปกติจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 12 กิโลเบส และ 7.4 กิโลเบส แต่ในคนที่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) จะได้ชิ้นส่วนขนาด 16 กิโลเบส และ 7.4 กิโลเบส ตามลำดับ ขั้นตอนการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) หรือ α^{+}- thalassemia ด้วยวิธี Southern blot hybridization ดังรูปที่ 4.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนในการตรวจสอบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) หรือ α^{+} - thalassemia ด้วยวิธี Southern blot hybridization

ขั้นตอนการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) หรือ α^{+}- thalassemia ด้วยวิธี Southern blot hybridization

การตรวจหารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ α^{+}- thalassemia โดยวิธี Southern blot hybridization ครั้งนี้ทำได้โดยการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วย เอ็นไซม์ B*am*HI หรือ B*gl* II ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมหลอด microtube ขนาด 1.5 มล.ใส่ DNA ตัวอย่าง 3-5 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตรรวม 250 ไมโครลิตรแล้วเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

10 X E buffer	30	ไมโครลิตร
100 มิลลิโมลาร์ spermidine	9	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	15.5	ไมโครลิตร
B*am*HI หรือ B*gl* II	1.5	ไมโครลิตร

อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส ใน water baht นาน 12-18 ชั่วโมง

2. หลังจาก 12-18 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ตัดได้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ dye 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า บนเจล agarose electrophoresis เพื่อตรวจดูว่าตัดได้สมบูรณ์หรือไม่

กรณีที่ตัดได้ไม่สมบูรณ์

นำดีเอ็นเอที่ตัดได้ไม่สมบูรณ์ จากข้อ 2 มาใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มล. แล้วเติมสารต่างๆดังนี้

- เติม 1/50 volume of 0.5 โมลาร์ EDTA
- เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร
- เติม phenol 150 ไมโครลิตร
- เติม $CHCl_3$ 150 ไมโครลิตร
- เขย่าประมาณ 5 นาที
- ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ดูดเอาเฉพาะน้ำละลายส่วนบนใส่หลอด microtube ใหม่
- เติม 1/10 volume of 3 โมลาร์ NaOAc
- เติม 2 volume of 100 % ethanol
- freeze ที่ – 80 องศาเซลเซียส 15 นาที

- ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ดูดเอา supernatant ออก
- ทำให้ดีเอ็นเอแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส
- ละลายด้วยน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตัดด้วยเอ็นไซม์ B*am*HI หรือ B*gl* II ใหม่

เมื่อตัดได้สมบูรณ์แล้วนำมาทำการตกตะกอน DNA ดังขั้นตอนต่อไปนี้

เตรียมหลอด microtube ขนาด 1.5 มล.แล้วเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

- เติม 1/50 volume of 0.5 โมลาร์ EDTA (4 ไมโครลิตร)
- เติม 1/10 volume of 2 โมลาร์ NaOAc (20 ไมโครลิตร)
- เติม 2 volume of 100 % ethanol (450 ไมโครลิตร)
- freeze ที่ –20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงหรือ –70 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที
- ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- ดูดน้ำส่วนบนทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol
- ดูด ethanol ทิ้งแล้วทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส รอนำไปแยกดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

การแยกดีเอ็นเอโดยตัดด้วยเอ็นไซม์ B*am*HI หรือ B*gl*II ด้วยวิธี agarosegel electrophoresis

นำดีเอ็นเอตัวอย่าง และดีเอ็นเอ control อย่างละ 10 ไมโครลิตร ที่ทำการตกตะกอนแล้วมาผสมกับ dye 3 ไมโครลิตร และนำ DNA size marker (λ/Hind III) 5 ไมโครลิตร ซึ่งจะต้องเติม TE buffer 5 ไมโครลิตร และ dye 3 ไมโครลิตร มาหยอดลงหลุม นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า บน 0.8 % เจล agarose electrophoresis ซึ่งใช้ comb ขนาด 15 ซี่ ใน 1XE buffer

- ปล่อยกระแสไฟฟ้าที่ 150 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งดีเอ็นเอที่ load เข้าไปในเนื้อเจลจนหมดแล้วปรับกระแสไฟฟ้าเป็น 35 มิลลิแอมแปร์แล้วนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าจนกระทั่งจนกระทั่ง dye เคลื่อนที่มาถึง 2/3 ของความยาวของเจล ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรนาน 10 นาทีนำไปส่องภายใต้แสง UV โดยใช้

เครื่อง UV transluminator เพื่อบันทึกขนาด DNA size marker (λ/Hind III) ทำการถ่ายรูปเจลเก็บไว้

ขั้นตอนการทำ blotting (capillary transfer)

- แช่เจลที่มีดีเอ็นเอตัวอย่าง ,ดีเอ็นเอ control และ ดีเอ็นเอ size marker(λ/Hind III) ใน 0.25 โมลาร์และเขย่าเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทำ partial depurination แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
- แช่แผ่นเจลใน depurination solution (0.5โมลาร์ NaOH/1.5โมลาร์ NaCl) 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
- แช่แผ่นเจลด้วย neutralization buffer (0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 7.5/3 โมลาร์ NaCl) 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
- ตัดกระดาษ 3 MM จำนวน 3 แผ่นขนาดยาวเพื่อทำหน้าที่ transfer buffer และขนาดเท่าเจลจำนวน 8-10 แผ่น เพื่อทำหน้าที่ดูดซับ buffer
- ตัดแผ่น nylon membrane 1 แผ่น และตัดกระดาษหนังสือพิมพ์ให้มีขนาดเท่ากับเจล
- แช่แผ่น nylon membrane ในน้ำกลั่นที่สเตอริไรส์ สักครู่จนเปียกทั่วแล้วแช่ใน 20XSSC (autoclave)
- เท 20XSSC ลงในถาด ปริมาณ 2/3 ของความสูงของถาด
- วางแผ่นกระจกบนถาด
- วางแผ่นกระดาษ 3 MM ขนาดยาว 3 แผ่น ลงบนกระจกและส่วนที่เหลือจุ่มลงไปใน 20XSSC ทั้ง 2 ด้าน ด้านละเท่าๆกัน
- เมื่อ 20XSSC ซึมเคลื่อนที่มาจนทั่วกระดาษ ไล่ฟองอากาศออกจากกระดาษให้เรียบ
- วางเจลลงบนกระดาษ 3 MM โดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นข้างล่างเจล
- นำแผ่น nylon membrane ที่แช่อยู่ใน 20XSSC วางบนแผ่น membrane กับเจล
- ปิดทับด้วยกระดาษ 3MM ขนาดเท่าเจล 8-10 แผ่น และปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์สูงประมาณ 10 ซม.
- วางทับด้วยสิ่งของที่มีน้ำหนักพอสมควรในที่นี้ใช้กล่องบรรจุน้ำให้ได้น้ำหนักตามต้องการ
- ทิ้งให้มีการถ่ายดีเอ็นเอจากเจลเข้าสู่แผ่น nylon membrane ข้ามคืน

- หลังจาก transfer แล้ว เอาหนังสือพิมพ์และกระดาษที่เปียกทิ้งไป
- ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งบน nylon membrane แล้วใช้คีมพลาสติกหยิบ nylon membrane วางลงบนกระดาษสะอาด รอให้แห้งแล้วนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส ใน hot air oven นาน 2 ชั่วโมง
- นำ nylon membrane ใส่ถุงกันร้อนอย่างหนาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไป hybridization

ขั้นตอน DNA prehybridization

การเตรียม prehybridization buffer ประกอบด้วยสารต่างๆต่อไปนี้

- 20 X SSC (autoclave)	10	มล.
- 20% N-laurylsarcosine	0.4	มล.
- 10% SDS	0.08	มล.
- blocking powder	0.4	กรัม
- ddH2O	29.12	มล.

เทสารละลาย prehybridization buffer ลงในถุงที่มี nylon membrane บรรจุอยู่ ไล่ฟองอากาศออกให้หมดปิดถุงให้สนิท นำไปอบที่ 65 องศาเซลเซียส (hot air oven) อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

ขั้นตอน DNA hybridization

1. เตรียมสารละลาย α–globin gene probe (ขั้นตอนการเตรียม probe แสดงไว้ในภาคผนวก) โดยนำสารละลาย α–globin gene probe ไปต้มในน้ำเดือด 5 นาทีแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที 5 นาที (quick cool)
2. ผสม α–globin probe จากข้อ 1. กับสารละลาย prehybridization buffer 4 มล.
3. รีดเอา pre-hybridization buffer ออกให้หมดจากถุงที่บรรจุ nylon membrane อยู่
4. เท probe solution ลงในถุงที่มี nylon membrane อยู่แล้วอบที่ 65 องศาเซลเซียส ใน hot air oven

ขั้นตอนการ washing and color detection

1) ดูดเอา α–globin probe ออกให้หมดหลังจาก hybridization แล้ว เก็บ probe ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส นำแผ่น nylon membrane มาใส่บนกล่องพลาสติกและล้างด้วย 2XSSC / 0.1% SDS ประมาณครั้งละ 150 มล. 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง

2) ล้างแผ่น nylon membrane ด้วย 0.5XSSC/0.1%SDS ครั้งละ 150 มล. 2 ครั้ง ที่ 65 องศาเซลเซียส

3) ล้าง nylon membrane ใน buffer 1 20 มล. ซึ่งอยู่บนฝากล่องพลาสติกที่ปูรองพื้นด้วยพลาสติกใส แล้วคีบแผ่น nylon membrane ใส่ถุงพลาสติกใหม่ แล้วเติม buffer 2 ลงไป 20 มล. incubate 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4) รีด buffer 2 ออกให้หมด เติม antibody solution (buffer 2 20 มล.+Dig-Ab 4 ไมโครลิตร) incubate 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

5) ล้างด้วย buffer 1 ครั้งละ 15 นาที 2 ครั้ง

6) แช่แผ่น nylon membrane ใน buffer 3 20 มล. 2 ครั้งครั้งละ 2-3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

7) เติม color development 30 มล. incubate ไว้ในที่มืดมากกว่า 12 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแถบชัดเจน

8) อ่านผลที่เกิดขึ้นและหยุดปฏิกริยาโดยล้างด้วย buffer 4 1-2 ครั้ง แล้วเก็บแผ่น nylon membrane ไว้ใน buffer 4 ตลอดไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการศึกษา

ในการศึกษาตัวอย่างเลือดจากประชากรชาวน้ำ 2 พื้นที่ คือ ชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย ตำบลไม้ขาว อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต จำนวน 64 ราย และชาวน้ำเกาะสิเหร่ ตำบลรัษฎา อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต จำนวน 65 ราย

แบ่งผลการศึกษาออกเป็น 4 ตอน คือ

ตอนที่ 1 ผลการตรวจสอบชนิดของฮีโมโกลบิน โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเลคโตรโฟเรซีส

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบินด้วยวิธีพีซีอาร์ และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะโดยแบ่งเป็น

2.1 ผลการศึกษาด้าน 3'- haplotype หรือ framework ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน (β^{E} - globin gene frameworks) กับ ยีนบีตาเอโกลบิน (β^{A} - globin gene frameworks)

2.2 ผลการศึกษาด้าน 5' haplotype ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน (β^{E} - globin gene) กับ ยีนบีตาเอโกลบิน (β^{A} - globin gene)

ตอนที่ 3 ผลการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ Southeast Asian type (- - SEA) หรือ α°- thalassemia โดยวิธีพีซีอาร์

ตอนที่ 4 ผลการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) โดยวิธี Southern blot

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาตอนที่ 1

1. ผลการตรวจสอบชนิดฮีโมโกลบิน โดยวิธี เซลลูโลสอะซิเตทอิเลคโตรโฟเรซีส

1.1 ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย จำนวน 64 ราย พบชนิดของฮีโมโกลบินเป็น A_2A จำนวน 60 ราย EA จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 93.75% และ 6.25 ตามลำดับ ความถี่ยีนบีตาอี 0.031 ดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย จำนวน 64 ราย

ชนิดฮีโมโกลบิน	จำนวนคน	ร้อยละ
A_2A	60	93.75
EA	4	6.25

$$\beta^E \text{ gene frequency : } 4 / 128 = 0.031$$

1.2 ในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่จำนวน 65 ราย พบชนิดของฮีโมโกลบินเป็น A_2A จำนวน 58 ราย EA จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 89.23 และ 10.76 ตามลำดับ ตามลำดับ ความถี่ยีนบีตาอี 0.054 ดังตารางที่ 5.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 แสดงผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่จำนวน 65 ราย

ชนิดฮีโมโกลบิน	จำนวนคน	ร้อยละ
A_2A	58	89.23
EA	7	10.76

β^E-gene frequency : 7 / 130 = 0.054

1.3 ในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน จำนวน 129 ราย พบชนิดของฮีโมโกลบินเป็น A_2A จำนวน 118 ราย EA จำนวน 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 91.47 และ8.5 ตามลำดับ ความถี่ยีนบีตาอี 0.043 ดังตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.3 แสดงผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน จำนวน 129 ราย

ชนิดฮีโมโกลบิน	จำนวนคน	ร้อยละ
A_2A	118	91.47
EA	11	8.53

β^E-gene frequency : 11 / 258 = 0.043

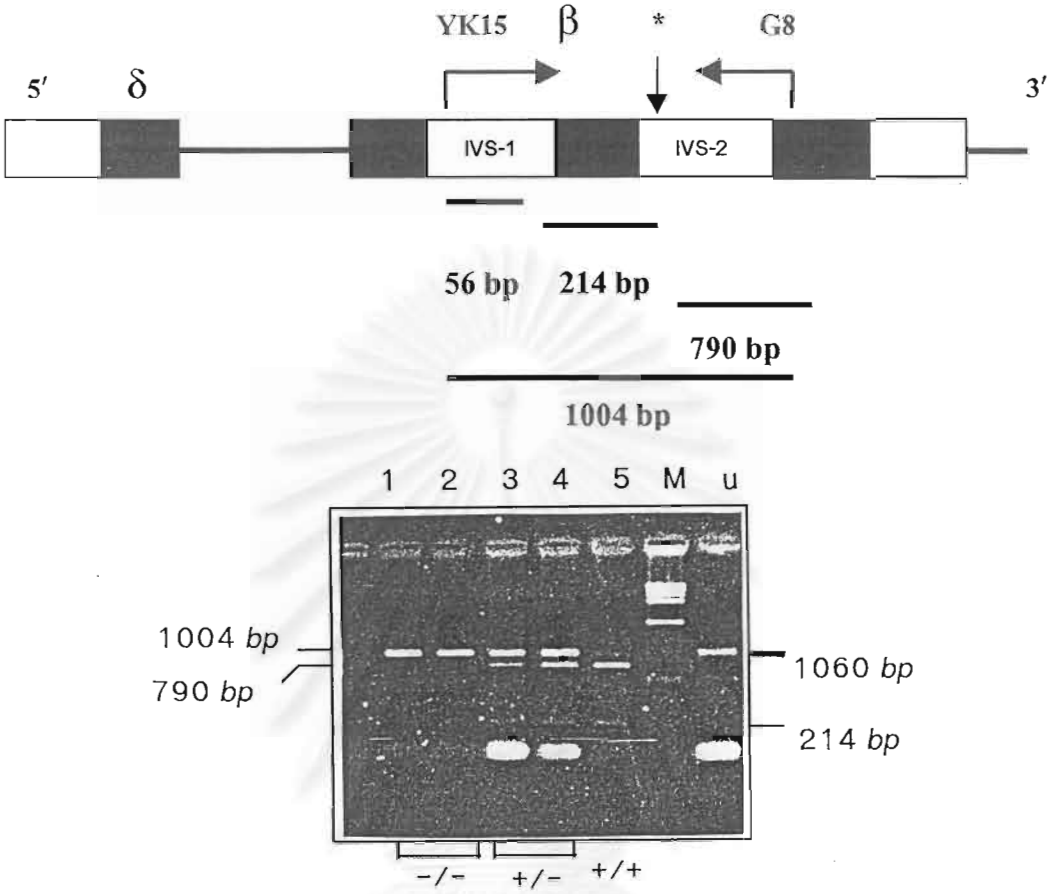
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาตอนที่ 2

2. ผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินโดยวิธีพีซีอาร์และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

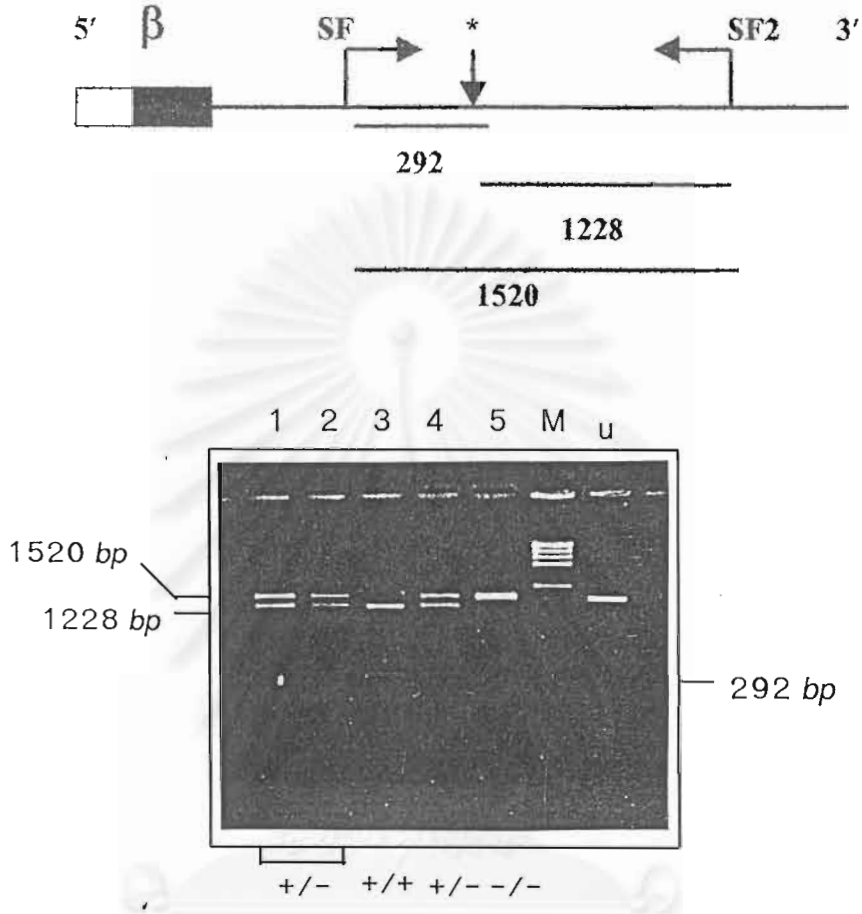
2.1 ผลการศึกษาด้าน 3'-haplotype หรือ FW ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย และเกาะสิเหร่ ดังภาพที่ 5.1 และ 5.2 โดยดูผลจากการตัดได้ + หรือ ตัดไม่ได้ – ในตำแหน่งที่ 6 β-A*va*II และตำแหน่งที่ 7 3' β-B*am*HI

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.1 บน โครงสร้างของยีนบีตาโกลบิน แสดงตำแหน่ง AvaII polymorphism (*) ในบริเวณ IVS-2 ของ β^{E}-globin gene และβ^{A}-globin gene (ตำแหน่งที่ 6 β-AvaII) โดยใช้ ไพรเมอร์ YK 15 และ G8 ซึ่งให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 1060 คู่เบส เมื่อชิ้นส่วนนี้ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ Ava II จะให้ชิ้นส่วนขนาด 790 คู่เบส และ 214 คู่เบส

ล่าง แสดงตัวอย่างผลการศึกษาในตำแหน่งที่ 6 β-AvaII ในประชากรชาวน้ำ ซึ่งแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis M = λ/HindIII DNA marker ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบขนาด U= PCR product ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอ็นไซม์ AvaII (control) , 1-5 เป็นตัวอย่าง ที่นำมาทำการศึกษา ตัวอย่างที่ 1 และ 2 เอ็นไซม์ AvaII ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 อัลลีล (-/-, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 1004 คู่เบส ขณะที่ตัวอย่างที่ 3 และ 4 เอ็นไซม์ AvaII สามารถตัดได้ เพียง 1 อัลลีล (+/-, heterozygote) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 1004 คู่เบส และ 790 คู่เบส และ 214 คู่เบส ตัวอย่างที่ 5 เอ็นไซม์ AvaII สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 อัลลีลเลย (+/+, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 790 คู่เบส และ 214 คู่เบส



รูปที่ 5.2 บน โครงสร้างของยีนบีตาอีโกลบิน แสดงตำแหน่ง B*am*HI polymorphism (*) ตำแหน่งที่ 7 3' β-B*am*HI) โดยใช้ ไพรเมอร์ SF_1 และ SF_2 ซึ่งจะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1520 คู่เบส เมื่อชิ้นส่วนนี้ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ B*am*H I จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 1228 คู่เบส และ 292 คู่เบส

ล่าง แสดงตัวอย่างของผลการศึกษาตำแหน่งที่ 7 3' β-B*am*HI ในประชากรชาวน้ำซึ่งแยกด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis M = λ/*Hid*III DNA marker U = PCR product ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ B*am*H I (control) 1-5 เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษา ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 4 เอ็นไซม์ B*am*HI สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เพียง 1 อัลลีล (+/-, heterozygote) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1520 คู่เบส และ 1228 คู่เบส และ 292 คู่เบส ตัวอย่างที่ 3 เอ็นไซม์ B*am*HI สามารถตัดได้ทั้ง 2 อัลลีล (+/+, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1228 คู่เบส และ 292 คู่เบส ส่วนตัวอย่างที่ 5 เอ็นไซม์ B*am*HI ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เลย (-/-, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1520 bp

2.1.1 ผลการศึกษา β^E- globin gene framework ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชยและประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่ แสดงในตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 แสดงผลการศึกษา β^E-globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชยและเกาะสิเหร่

β^E-gene frameworks	จำนวนโครโมโซม		จำนวนโครโมโซมทั้ง 2 หมู่บ้าน
	ท่าฉัตรไชย	เกาะสิเหร่	
2	3	7	10
3	1	-	1
รวม	4	7	11

จากตารางที่ 5.4 ผลการศึกษา β^E- globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย พบยีนบีตาอีโกลบินเป็นชนิด FW2 จำนวน 3 โครโมโซม และ FW3 จำนวน 1 โครโมโซม

สำหรับในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่พบ β^E-globin gene frameworks ชนิด FW2 จำนวน 7 โครโมโซม

ผลการศึกษา β^E-globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้านพบยีน β^E-globin gene frameworks เป็นชนิด FW จำนวน 10 โครโมโซม และ FW3 จำนวน 1 โครโมโซม

2.1.2 ผลการศึกษา β^A-globin gene framework ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชยและประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่ แสดงใน ตารางที่ 5.5

ตารางที่ 5.5 แสดงผลการศึกษา β^A- globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชยและเกาะสิเหร่

β^A-gene frameworks	จำนวนโครโมโซม		จำนวนโครโมโซมทั้ง 2 หมู่บ้าน
	ท่าฉัตรไชย	เกาะสิเหร่	
1	4	4	8
2	29	32	61
3	53	38	91
รวม	86	47	160

จากตารางที่ 5.4 ผลการศึกษา β^A-globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชยพบยีนบีตาเอโกลบินเป็นชนิด FW1 จำนวน 4 โครโมโซม FW2 จำนวน 29 โครโมโซม และ FW3 จำนวน 53 โครโมโซม

สำหรับในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่พบ β^A-globin gene frameworks ชนิด FW1 จำนวน 4 โครโมโซม FW2 จำนวน 32 โครโมโซม และ FW3 จำนวน 38 โครโมโซม

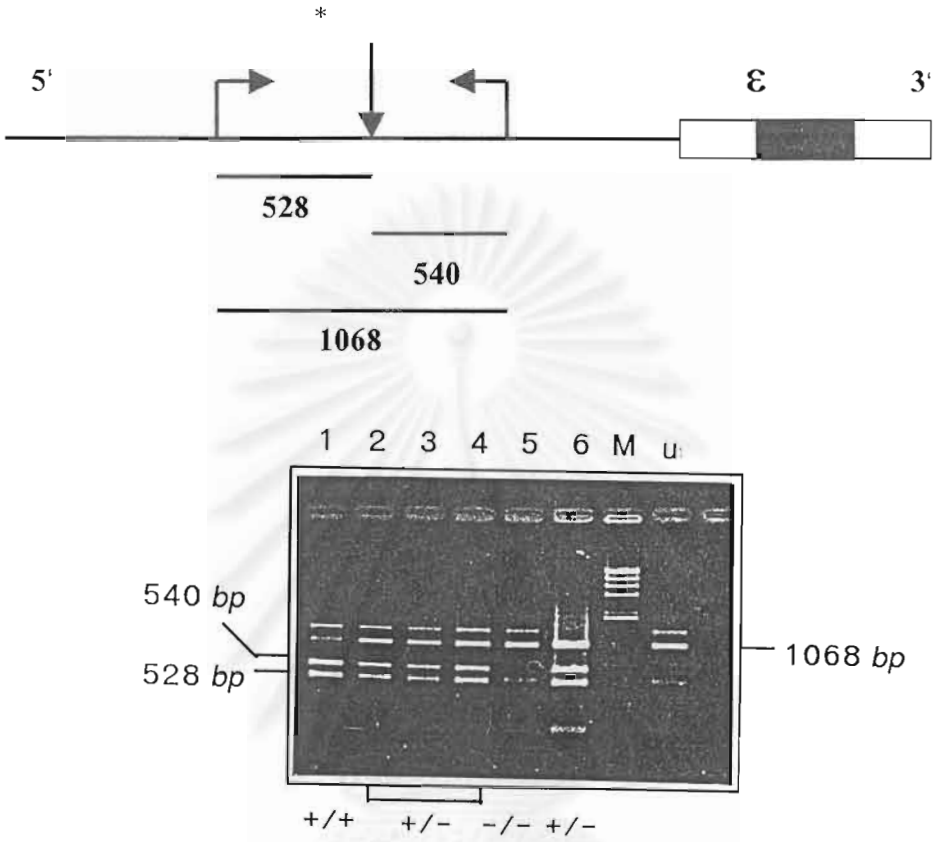
ผลการศึกษา β^A-globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้านพบยีน β^A-globin gene frameworks เป็นชนิด FW1 จำนวน 8 โครโมโซม FW2 จำนวน 61 โครโมโซม และ FW3 จำนวน 91 โครโมโซม

เมื่อทราบผลการศึกษา β^{E}-globin gene frameworks และ β^{A}-globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชยและเกาะสิเหร่แล้ว เลือกตัวแทนจากตัวอย่างที่มียีนบีตาอี และยีนบีตาเอ เพื่อนำไปศึกษา ส่วนของ 5'-haplotype ซึ่งจะทำให้ได้แฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีและแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินอย่างสมบูรณ์ โดยมี polymorphic restriction sites ครบทั้ง 7 ตำแหน่ง

2.2 ผลการศึกษาดีเอ็นเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน

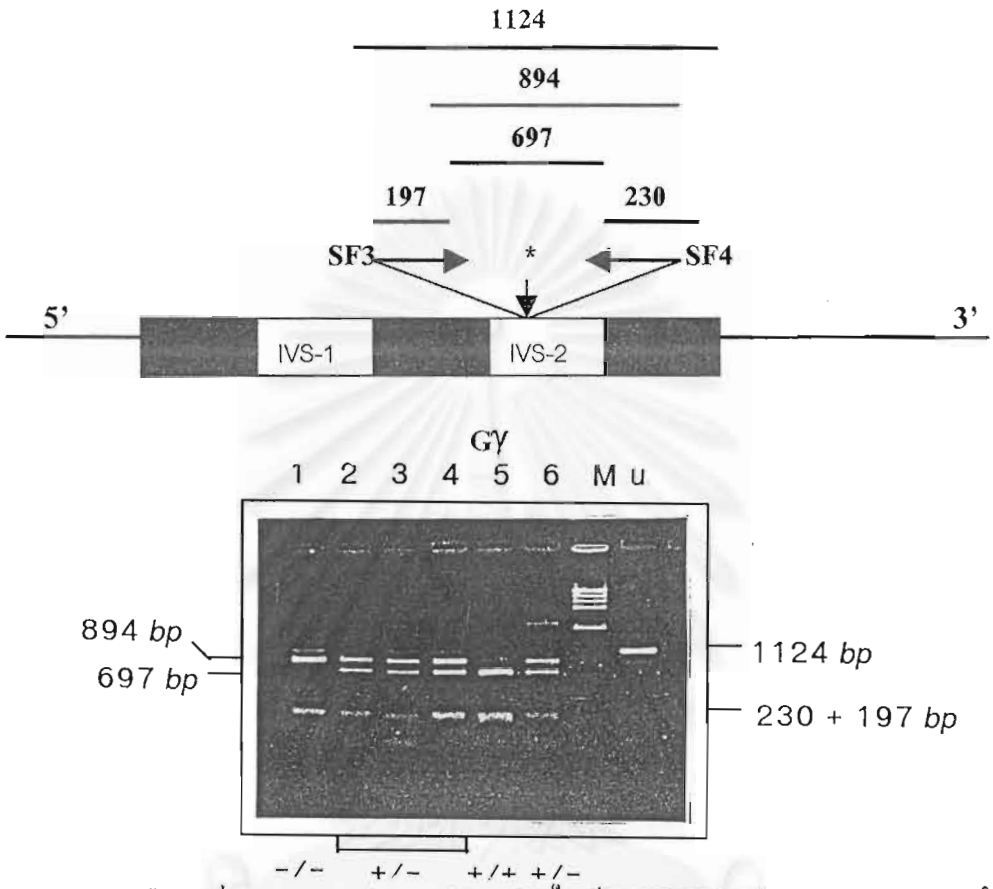
ผลการศึกษาในส่วนของ 5'-haplotype ที่ได้จะเรียงลำดับโดยเริ่มจาก ตำแหน่งที่ 1 5' ε-H*inc*II ตำแหน่งที่ 2 Gγ-H*ind*III ตำแหน่งที่ 3 Aγ-H*ind*III ตำแหน่งที่ 4 β-H*inc*II และตำแหน่งที่ 5 3' β-H*inc*II ดังต่อไปนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



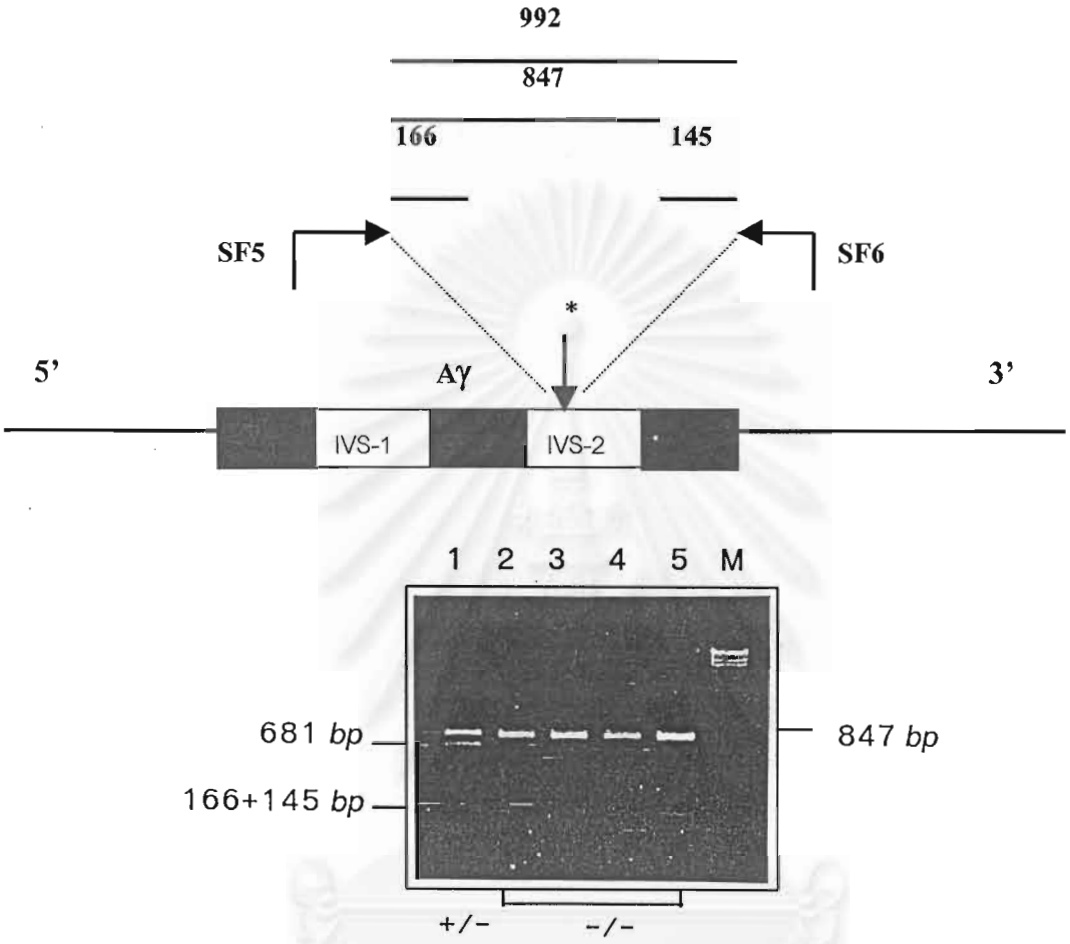
รูปที่ 5.3 บน แสดงตำแหน่ง *Hin*cII polymorphism (*) อยู่บริเวน 5' ถึง ε-globin gene (ตำแหน่งที่ 1 5' ε- HincII) โดยใช้ไพรเมอร์ SF_7 และ SF_8 ซึ่งจะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1068 คู่เบสเมื่อถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hin*cII จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 540 คู่เบส และ 528 คู่เบส

ล่าง แสดงตัวอย่างของผลการศึกษาตำแหน่งที่ 1 5' ε- *Hin*cII ในประชากรชาวน้ำแยกด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis, M = λ/Hind III DNA marker U = PCR product ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hin*cII (control) 1-6 เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษา ในตัวอย่างที่ 1 นั้น เอ็นไซม์ *Hin*cII สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 อัลลีล (+/+, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 540 คู่เบส และ 528 คู่เบส ตัวอย่างที่ 2, 3, 4 และ 6 เอ็นไซม์ *Hin*cII ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เพียง 1 อัลลีล (+/-, heterozygote) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1068 คู่เบส 540 คู่เบส และ 528 คู่เบส ส่วนตัวอย่างที่ 5 เอ็นไซม์ *Hin*cII ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เลยทั้ง 2 อัลลีล (-/-, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1068 คู่เบส



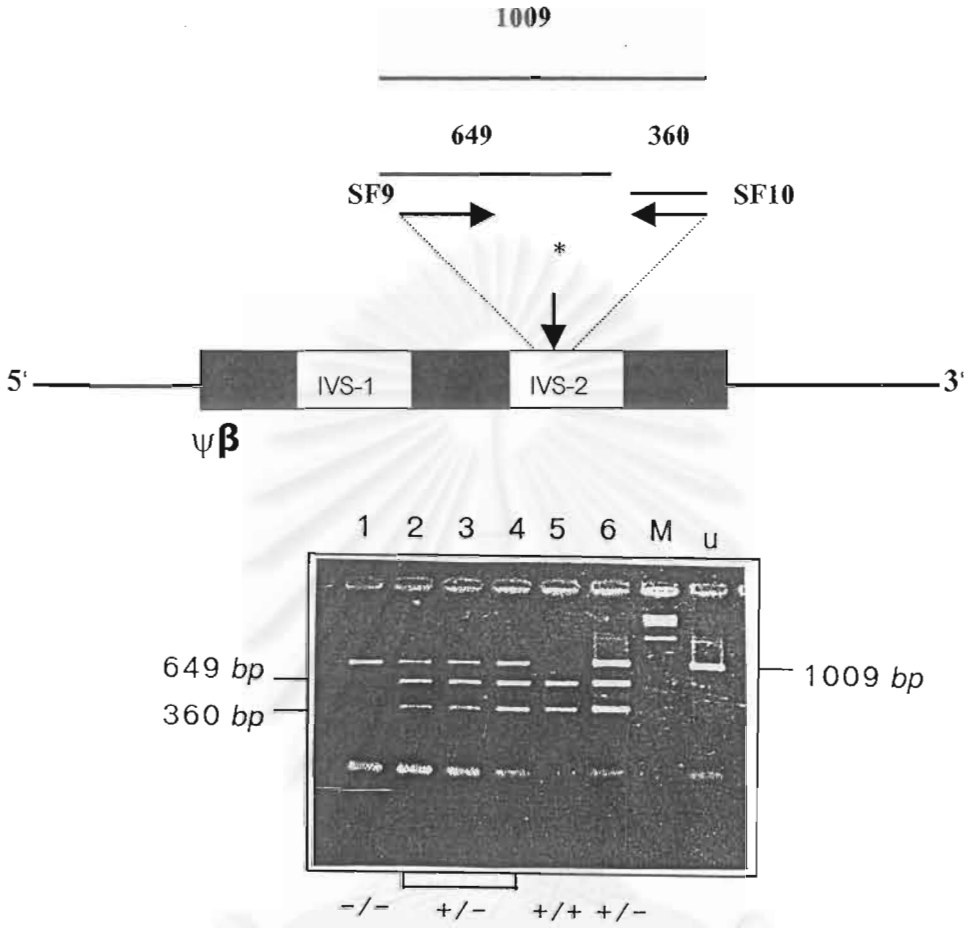
รูปที่ 5.4 บน แสดงตำแหน่ง *Hin*dIII polymorphism (*) ในส่วน IVS 2 ของ Gγ-globin gene (ตำแหน่งที่ 2 Gγ- *Hin*dIII) โดยใช้ไพรเมอร์ SF3 และ SF4 ซึ่งจะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 1124 คู่เบส เมื่อถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hin*d III จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 697 คู่เบส

ล่าง แสดงตัวอย่างของผลการศึกษาตำแหน่งที่ 2 Gγ-*Hin*dIII ในประชากรชาวน้ำแยกด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis, M = λ / *Hin*dIII DNA marker, U = PCR product ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (control) 1-6 เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษา ตัวอย่างที่ 1 เอ็นไซม์ *Hin*dIII ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เลยทั้ง 2 อัลลีล (-/-, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 894 คู่เบสเท่านั้น ตัวอย่างที่ 2, 3, 4 และ 6 เอ็นไซม์ *Hin*dIII ตัดได้ 1 อัลลีล (+/-,heterozygote) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 894 คู่เบส และ 697 คู่เบส ตัวอย่างที่ 5 เอ็นไซม์ *Hin*dIII สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 อัลลีลเลย (+/+, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 697 คู่เบส



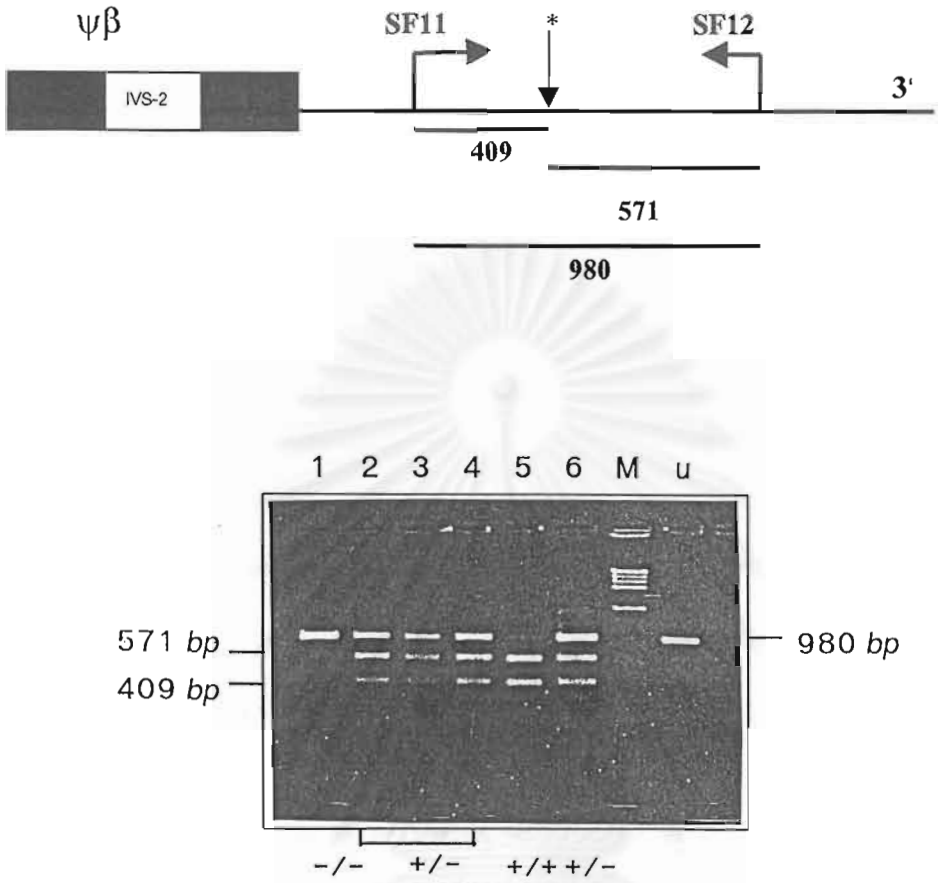
รูปที่ 5.5 บน แสดงตำแหน่ง Hind III polymorphism (*) ในส่วน IVS-2 ของ Aγ-globin gene (ตำแหน่งที่ 3 Aγ-Hind III) โดยใช้ไพรเมอร์ SF_5 และ SF6 ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 992 คู่เบส เมื่อ ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ Hind III ซึ่งจะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 681 คู่เบส

ล่าง แสดงตัวอย่างของผลการศึกษาตำแหน่งที่ 3 Aγ-Hind III ในประชากรชาวน้ำ แยกด้วย 1.0% garose gel electrophoresis, M = λ/Hind III DNA marker U = PCR product ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ Hind III (control) 1-5 เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษา ตัวอย่างที่ 1 เอ็นไซม์ Hind III ตัดได้ 1 อัลลีล (+/-, heterozygote) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 847 คู่เบส และ 681 คู่เบส ตัวอย่างที่ 2-5 เอ็นไซม์ Hind III ไม่สามารถตัดได้เลยทั้ง 2 อัลลีล (-/-,homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 847 คู่เบสเท่านั้น



รูปที่ 5.6 <u>บน</u> แสดงตำแหน่ง *Hin*cII polymorphism (*) ในส่วน IVS-2 ของ ψβ-globin gene (ตำแหน่งที่ 4, ψβ-*Hin*cII) โดยใช้ไพรเมอร์ SF_9 และ SF_{10} ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 1009 คู่เบส เมื่อถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hin*cII จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 649 คู่เบส และ 360 คู่เบส

<u>ล่าง</u> แสดงตัวอย่างของผลการศึกษาตำแหน่งที่4, ψβ-*Hin*cII ในประชากรชาวน้ำ แยกด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis M = λ/*Hin*d III DNA marker, U = PCR product ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hin*cII (control) 1-6 เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษา ตัวอย่างที่ 1 เอ็นไซม์ *Hin*cII ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เลยทั้ง 2 อัลลีล (-/-, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1009 คู่เบส ตัวอย่างที่ 2, 3, 4 และ 6 เอ็นไซม์ *Hin*cII ตัดได้ 1 อัลลีล (+/-, heterozygote) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1009 คู่เบส 649 คู่เบส และ 360 คู่เบส และ ตัวอย่างที่ 5 เอ็นไซม์ *Hin*cII สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอได้ 2 อัลลีล (+/+, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 649 คู่เบส และ 360 คู่เบส

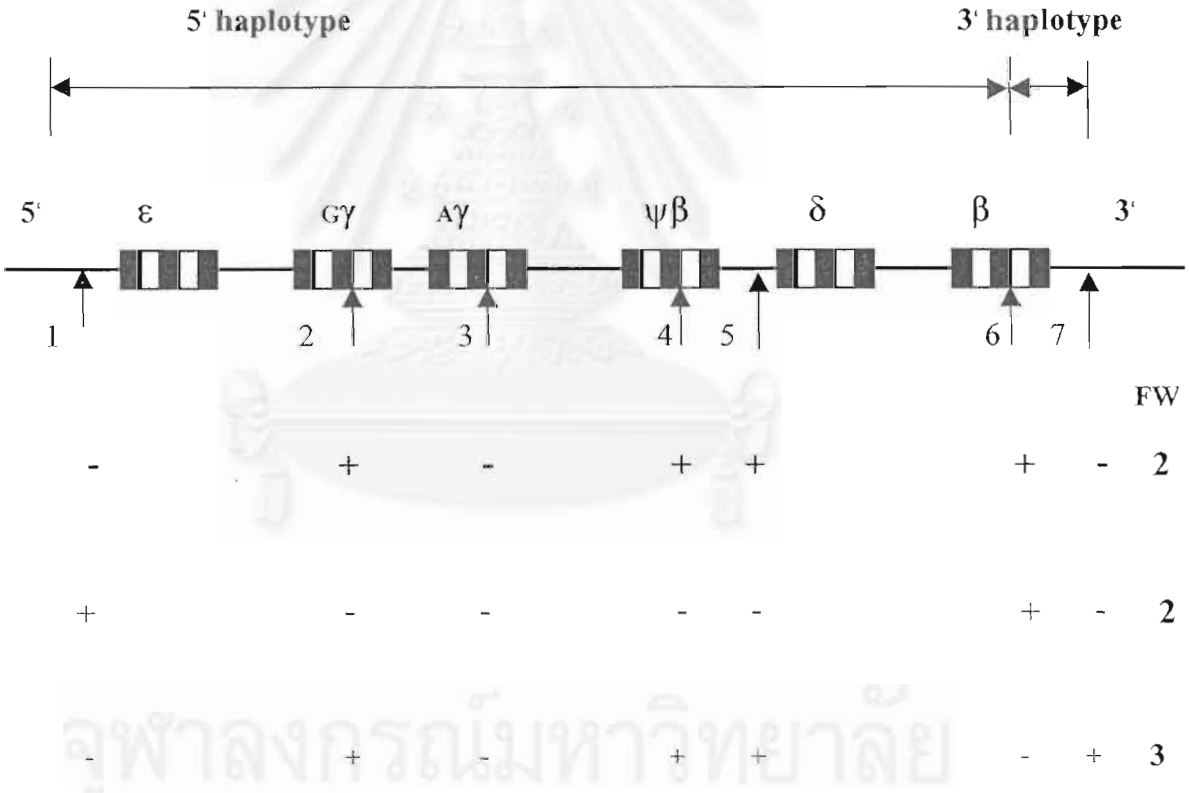


รูปที่ 5.7 <u>บน</u> แสดงตำแหน่ง *Hinc*II polymorphism (*) บริเวณ 3' ψβ-globin gene (ตำแหน่งที่ 5, 3' ψβ-*Hinc*II) ซึ่งมีความจำเพาะต่อเอ็นไซม์ *Hinc*II โดยใช้ไพรเมอร์ SF_{11} และ SF_{12} ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 980 คู่เบส เมื่อถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hinc* II จะให้ชิ้น ส่วนดีเอ็นเอขนาด 571 คู่เบส และ 409 คู่เบส

<u>ล่าง</u> แสดงตัวอย่างของผลการศึกษาตำแหน่งที่ 5 3' ψβ-*Hinc*II ในประชากรชาวน้ำ แยกด้วย 1.0 % agarose gel electrophoresis M = λ/*Hin*d III DNA marker U = PCR product ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinc*II (control) 1-6 เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษา ตัวอย่างที่ 1 เอ็นไซม์ *Hinc*II ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 อัลลีล (-/-, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 980 คู่เบส ตัวอย่างที่ 2, 3, 4 และ 6 เอ็นไซม์ *Hinc*II สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ 1 อัลลีล (+/-, heterozygote) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 980 คู่เบส 571 คู่เบส และ 409 คู่เบส สำหรับตัวอย่างที่ 5 เอ็นไซม์ *Hinc*II สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 อัลลีล (+/+, homozygotes) จึงเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 571 คู่เบส และ 409 คู่เบส

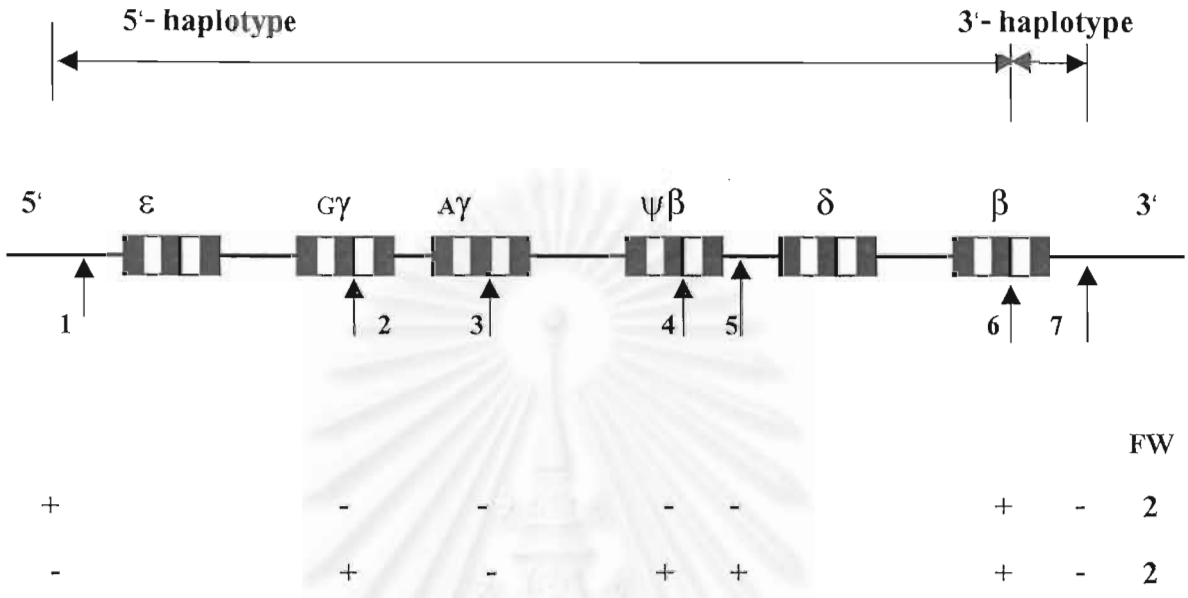
2.2.1 ผลการศึกษาดีเอ็นเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน

นำผลการศึกษาด้าน 3'-haplotype (β^E-globin gene frameworks) ที่ได้ทำการศึกษาก่อนแล้วมาเขียนรวมกันเป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย ดังแสดงในรูปที่ 5.8 และลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่ ดังแสดงรูปที่ 5.9 สำหรับลักษณะ แฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินที่พบในประชากรชาวน้ำ ทั้ง 2 หมู่บ้าน ดังแสดงรูปที่ 5.10



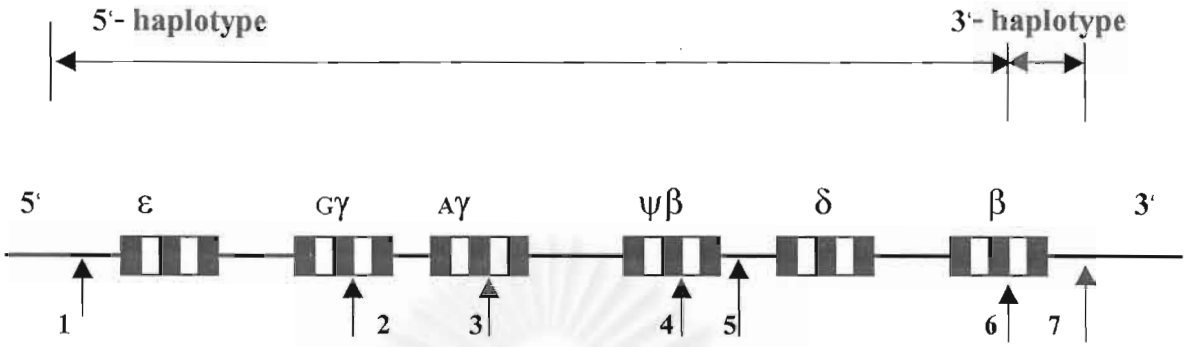
รูปที่ 5.8 แสดงผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน ที่พบในประชากรชาวน้ำที่ท่าฉัตรไชย เป็น ชนิด FW2 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - - β^E + - หรือแบบ - + - + + β^E + - จำนวน 3 โครโมโซม และชนิด FW3 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ - + - + + β^E - + จำนวน 1 โครโมโซม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.9 แสดงผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน ที่พบในประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ เป็นชนิด FW2 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - - β^E + - หรือ - + - + + β^E + - จำนวน 7 โครโมโซม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



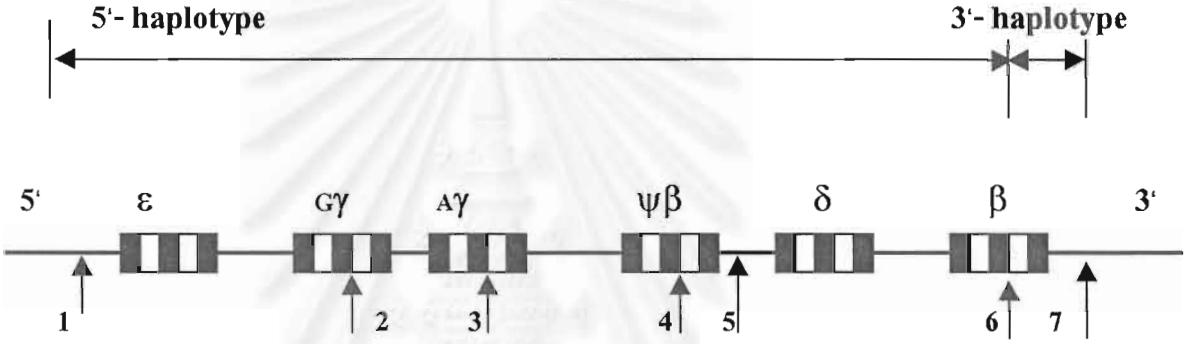
								FW
+	-	-	-	-	+	-		2
-	+	-	+	+	+	-		2
-	+	-	+	+	-	+		3

รูปที่ 5.10 แสดงผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน ที่พบในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน เป็นชนิด FW2 มีแฮปโพลไทป์ เป็นแบบ + - - - - β^E + - หรือ - + - + + β^E + - จำนวน 10 โครโมโซม และชนิด FW 3 มีแฮปโพลไทป์ เป็นแบบ + - - - - β^E - + จำนวน 1 โครโมโซม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

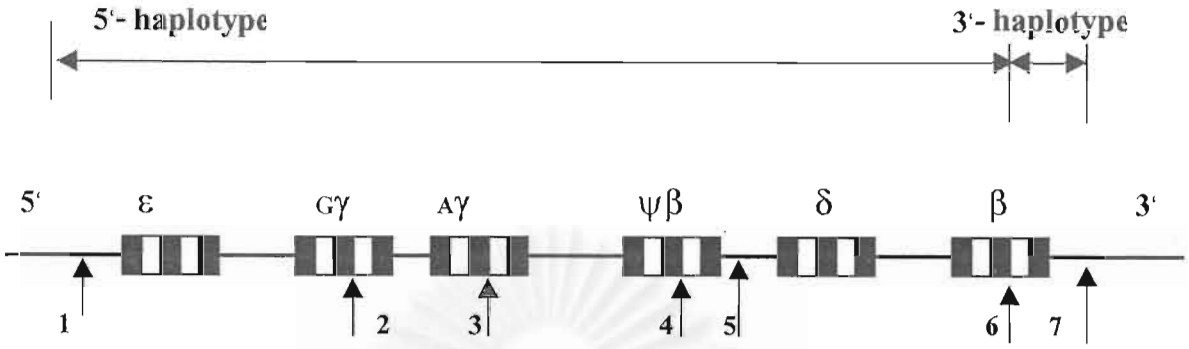
2.2.2 ผลการศึกษาดีเอ็นเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาเอโกลบิน

นำผลการศึกษาด้าน 3'-haplotype (β^A-globin gene frameworks) ที่ได้ทำการศึกษาก่อนแล้วมาเขียนรวมกันเป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย ดังแสดงในรูปที่ 5.11 และลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่ ดังแสดงรูปที่ 5.12 สำหรับลักษณะ แฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินที่พบในประชากรชาวน้ำ ทั้ง 2 หมู่บ้าน ดังแสดงรูปที่ 5.13



							FW
+	-	-	-	-	+	-	2
+	-	-	-	-	-	+	3
-	+	-	+	+	-	+	3

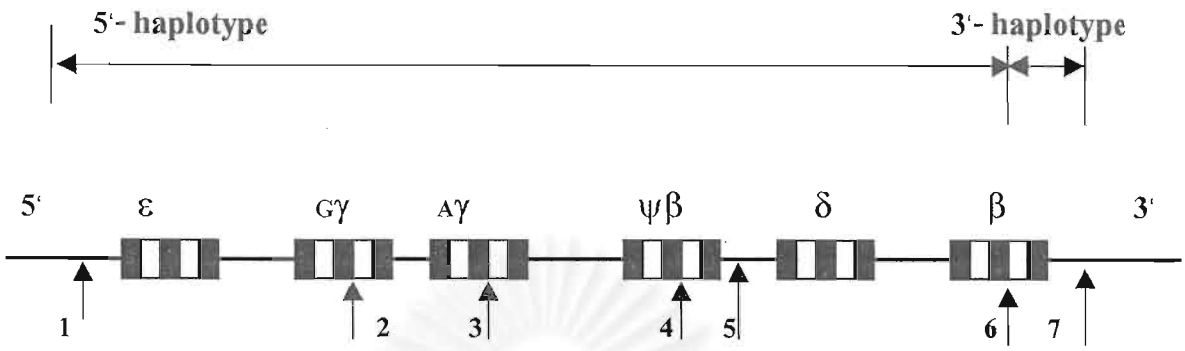
รูปที่ 5.11 แสดงผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบิน ที่พบในประชากรชาวน้ำที่ท่าฉัตรไชยเป็นชนิด FW 2 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - - β^A + - จำนวน 4 โครโมโซม และชนิด FW 3 มีแฮปโพลไทป์ เป็นแบบ + - - - - β^A - + จำนวน 1 โครโมโซมและแบบ - + + - + β^A - + จำนวน 5 โครโมโซม



								FW
+		-	-		-	-	+	-	2
+		-	-		-	-	-	+	3
-		+	-		+	+	-	+	3

รูปที่ 5.12 แสดงผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบิน ที่พบในประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่เป็นชนิด FW 2 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - - β^A + - จำนวน 5 โครโมโซม และชนิด FW 3 มีแฮปโพลไทป์ เป็นแบบ + - - - - β^A - + จำนวน 4 โครโมโซมและแบบ - + + - + β^A - + จำนวน 1 โครโมโซม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



								FW
+	-	-	-	-	+	-		2
+	-	-	-	-	-	+		3
-	+	-	+	+	-	+		3

รูปที่ 5.13 แสดงผลการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอโกลบิน ที่พบในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน เป็นชนิด FW 2 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - - β^A + - จำนวน 9 โครโมโซม และชนิด FW 3 มีแฮปโพลไทป์ เป็นแบบ + - - - - β^A - + จำนวน 5 โครโมโซมและแบบ - + + - + β^A - + จำนวน 6 โครโมโซม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาตอนที่ 3

3. ผลการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ Southeast Asian Type (- - SEA) หรือ α^0- thalassemia โดยวิธีพีซีอาร์

ผลการศึกษาแบบการขาดหายไปแบบ Southeast Asian Type (- -SEA) ในประชากรชาวน้ำ 2 หมู่บ้านที่บ้านท่าฉัตรไชยและเกาะสิเหร่จำนวน 39 ราย พบยีน - -SEA ไม่พบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ Southeast Asian Type (- -SEA) หรือ α^0- thalassemia เลย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาตอนที่ 4

4.1 ผลการศึกษาการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion (- $\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (- $\alpha^{4.2}$) โดยวิธี Southern bolt

ผลการศึกษาการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletion (-$\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion (-$\alpha^{4.2}$) ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย พบการขาดหายไปแบบ rightward deletion จำนวน 3 ราย และไม่พบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ leftward deletion โดยสุ่มตัวอย่างมา 22 ราย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5.6

ตารางที่ 5.6 แสดงความถี่ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletion ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย

จีโนไทป์	จำนวนคน	ร้อยละ
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	19	86.36
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	3	13.64
รวม	22	100

$-\alpha^{3.7}$ gene frequency : 3 / 44 = 0.068

เกาะสิเหร่พบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletion จำนวน 3 ราย และไม่พบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ leftward deletion โดยสุ่มตัวอย่างมา 17 ราย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5.7

ตารางที่ 5.7 แสดงความถี่ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion ในประชากรชาวน้ำเกาะสิเหร่

จีโนไทป์	จำนวนคน	ร้อยละ
αα/αα	14	82.35
$-\alpha^{3.7}$/αα	2	11.76
$-\alpha^{3.7}$/ $-\alpha^{3.7}$	1	5.89
รวม	17	100

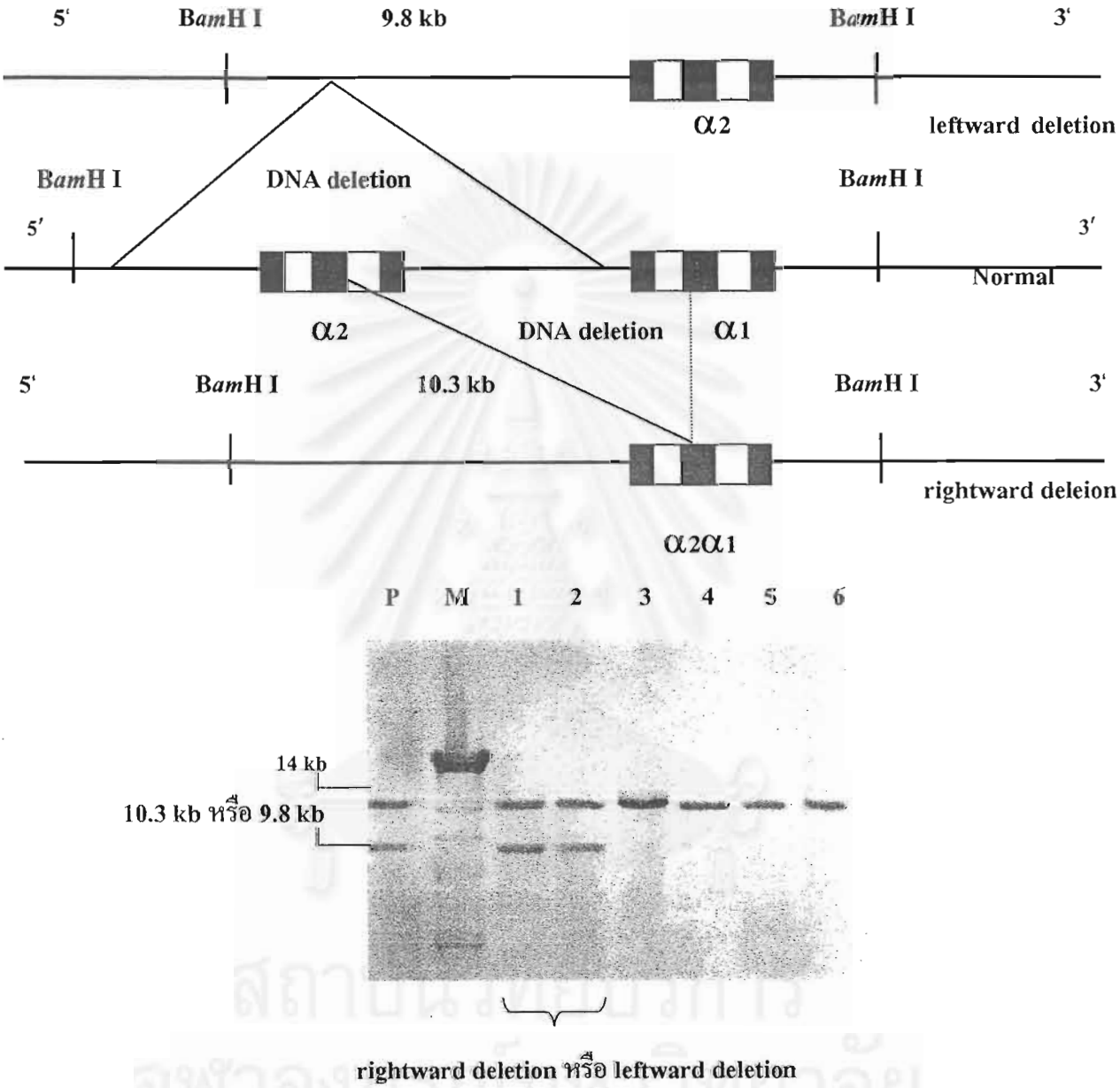
$-\alpha^{3.7}$ gene frequency : 2+ 2 (1) / 34 = 0.12

สำหรับการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion และ leftward deletion ในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้านพบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletion จำนวน 6 ราย และไม่พบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ leftward deletion จากประชากรชาวน้ำที่สุ่มตัวอย่างมา 39 ราย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5.8

ตารางที่ 5.8 แสดงความถี่ของการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletionในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน

จีโนไทป์	จำนวนคน	ร้อยละ
αα/αα	33	84.62
$-\alpha^{3.7}$/αα	5	12.82
$-\alpha^{3.7}$/$-\alpha^{3.7}$	1	2.56
รวม	39	100

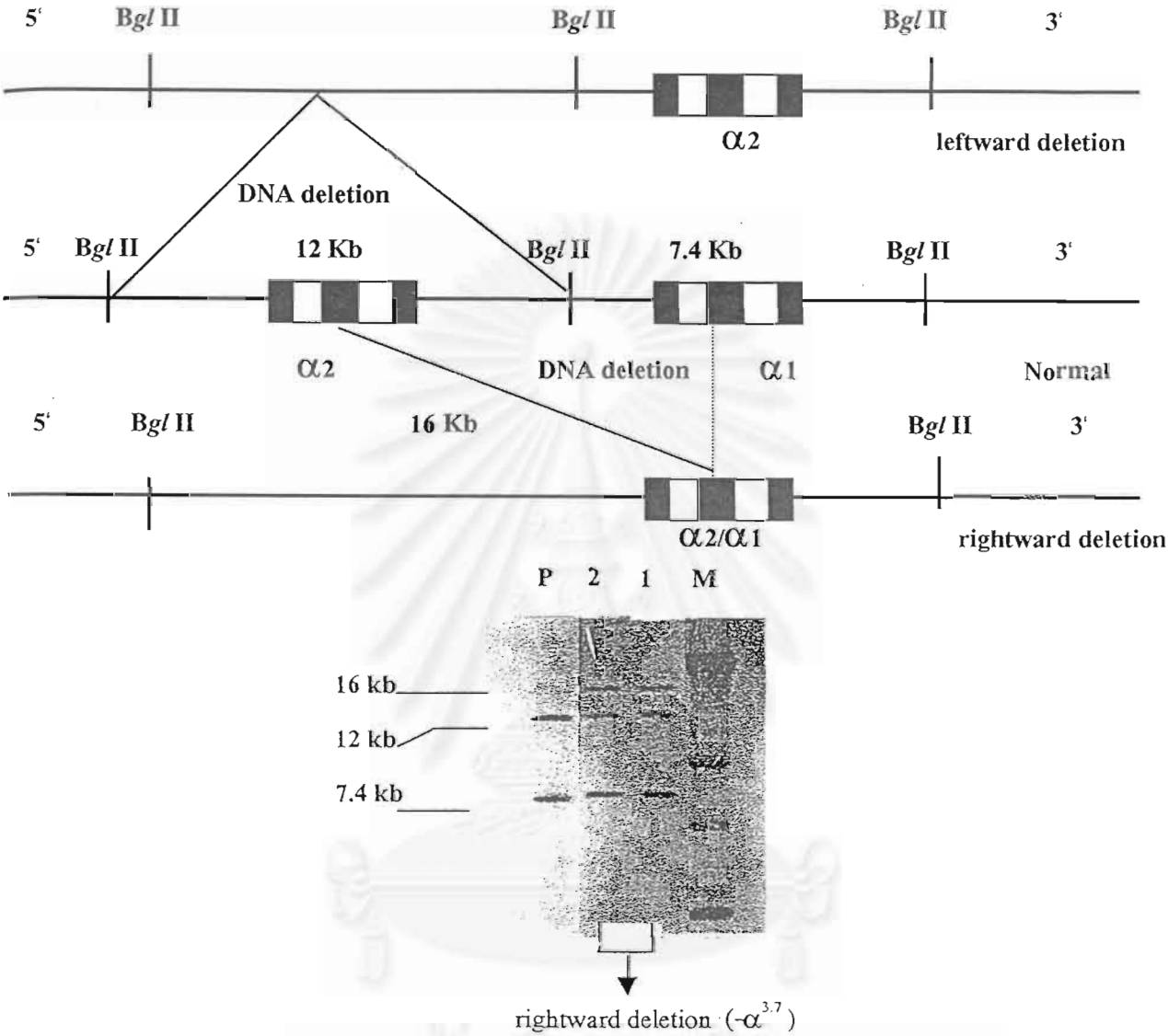
$-\alpha^{3.7}$ gene frequency : 5+ 2 (1) / 78 = 0.089



รูปที่ 5.14 บน แผนที่ยีน (DNA mapping) แสดงตำแหน่งของเอ็นไซม์ BamHI ในกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน ในคนปรกติถ้ามีการตัดด้วยเอ็นไซม์ BamHI จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 14.0 กิโลเบส ในคนที่มีรูปแบบการขาดหายไปของยีน แบบ rigthward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 9.8 กิโลเบส และ 10.3 กิโลเบส ตามลำดับ

ล่าง แผ่น nylon membrane แสดงตัวอย่างของผลการศึกษารูปแบบการขาดหายไปแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) หรือ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) ของชาวน้ำโดยการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ B*am*HI M= λ/H*ind* III P = มีรูปแบบการขาดหายไปแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) หรือ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) (positive control) 1-6 เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษา ตัวอย่างที่ 1 และ 2 พบรูปแบบการขาดหายไปแบบ rightward deletion หรือ leftward deletion ซึ่งมีขนาดแถบดีเอ็นเอเป็น 14 กิโลเบส และ (9.8 กิโลเบส หรือ10.3 กิโลเบส) สำหรับตัวอย่างที่ 3, 4, 5 และ 6 ไม่มีการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ rightward deletion หรือ leftward deletion แบบใดแบบหนึ่ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.15 บน แผนที่ดีเอ็นเอ (DNA mapping) แสดงตำแหน่งของเอ็นไซม์ Bgl II ในกลุ่มยีนแอลฟาโกลบิน ในคนปรกติ ถ้ามีการตัดด้วย เอ็นไซม์ Bgl II จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 12.0 กิโลเบส และ 7.4 กิโลเบส ในคนที่มีรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rigtward deletion ($-\alpha^{3.7}$) และ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) จะได้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ขนาด 7.4 กิโลเบส และ 16 กิโลเบส

ล่าง แผ่น nylon membrane แสดงผลการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของชาวน้ำด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Bgl II M= λ/Hind III P= มีรูปแบบการขาดหายไปแบบ leftward deletion ($-\alpha^{4.2}$) (positive control) โดยตัวอย่างที่ 1, 2 มีการขาดหายไป แบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 16 กิโลเบส 12 กิโลเบส และ 7.4 กิโลเบส

บทที่ 6

อภิปรายผลการศึกษา

1. การศึกษาความถี่ของยีนบีตาอีโกลบิน

จากการตรวจสอบชนิดฮีโมโกลบินโดยวิธีเซลลูโลสอะซิเตทอิเลคโตรโฟเรซีสในประชากรชาวน้ำ 2 กลุ่ม พบฮีโมโกลบินผิดปรกติชนิด HbE ชนิด EA ในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย จำนวน 4 ราย จากประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชยทั้งหมด 64 ราย คิดเป็นความถี่ยีนบีตาอี 0.031 นอกจากนี้ในชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ พบ HbE ชนิด EA จำนวน 7 ราย จากจำนวนประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ ทั้งหมด 65 ราย คิดเป็นความถี่ยีนบีตาอี 0.054

ประชากรชาวน้ำรวมทั้ง 2 หมู่บ้านจำนวน 129 ราย พบ HbE ชนิด EA จำนวน 11 ราย คิดเป็นความถี่ยีนบีตา 0.043

HbE เป็นฮีโมโกลบินผิดปรกติที่ตรวจพบได้บ่อยในกลุ่มประชากรพื้นเมืองหลากหลายชาติพันธุ์จากพื้นที่ราบของเอเชียอาคเนย์ พบความถี่ HbE ค่อนข้างสูง (ประมาณ 15 ถึง 25 เปอร์เซ็นต์) ในกลุ่มชาติพันธุ์ไทย – ลาวจากประเทศลาวและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีระดับความถี่ใกล้เคียงกับที่พบในกลุ่มเขมรต่ำ (ซึ่งพูดภาษาตระกูลมอญ – เขมร) จากประเทศกัมพูชา ส่วนความถี่ HbE ในคนไทยภาคกลางพบฮีโมโกลบินอี ต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ และคนไทยภาคเหนือต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการกระจายความถี่ของ HbE ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์อย่างเฉพาะเจาะจงกับการกระจายตัวของตระกูลภาษาพูดพื้นเมืองในเอเชียอาคเนย์

การที่พบความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินของชาวน้ำทั้ง 2 กลุ่มที่บ้านท่าฉัตรไชย และเกาะสิเหร่ พบว่าความถี่ของยีนบีตาอีโกลบินไม่สูงมากนัก (0.031 และ 0.054 ตามลำดับ) อาจจะมีสาเหตุมาจากตามประวัติศาสตร์ชาวน้ำมีการอพยพย้ายถิ่นมาตามลุ่มแม่น้ำโขง ซึ่งเป็นบริเวณที่พบชาวเขมรอาศัยอยู่และมีความถี่ยีนบีตาอีอยู่แล้วและอาจเกิดการแต่งงานระหว่างชาวน้ำกับชาวพื้นบ้านจึงทำให้พบความถี่ยีนบีตาอีในชาวน้ำ และอาจเนื่องมาจากลักษณะภูมิประเทศในภาคใต้ของประเทศไทยมีอากาศเย็นและชื้นจึงทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการระบาดของโรคมาลาเรียในอดีตซึ่งนำมาถึงการคัดเลือกทางธรรมชาติของ HbE ที่มีต่อโรคมาลาเรียขึ้น

2. การศึกษาดีเอ็นเอเฟรมเวิร์คและดีเอ็นเอแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน

2.1 การศึกษาดีเอ็นเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาอีโกลบินในชาวน้ำ จ. ภูเก็ต

การที่ประชากรมี β^E– globin gene frameworks ที่ต่างกันแสดงว่ามีต้นกำเนิดที่ต่างกัน (independent origin) ในทางตรงกันข้ามถ้ามี β^E– globin gene frameworks เหมือนกันแสดงว่ามีต้นกำเนิดเดียวกัน (dependent origin)

ในประชากรชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบ β^E-globin gene frameworks 2 ชนิด คือ FW 2 (A*va*II + B*am*HI -) และ FW 3 (Asian) (A*va*II - B*am*HI +) (Antonarakis และคณะ,1982) แสดงว่ายีนบีตาอีมีอย่างน้อย 2 ต้นกำเนิดทั้งนี้ เนื่องจากการเปลี่ยนจาก frameworks หนึ่งไปเป็นอีก frameworks หนึ่งต้องเกิด crossing – over ซึ่งโอกาสเกิดนั้นน้อยมากโดยเฉพาะเกิด crossing – over ในช่วงที่สั้นมากคือ 70 นิวคลีโอไทด์จาก β^E– globin gene ถึง Hg*i*A1 site (Antonarakis และคณะ, 1982 b)

จากการศึกษาดีเอ็นเอ framework ของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชย ต.ไม้ขาว อ. ถลาง จ. ภูเก็ต จำนวน 4 โครโมโซม พบว่ายีนบีตาอีโกลบินมีลักษณะ FW 2 3 โครโมโซม FW 3 1 โครโมโซม แนวโน้มของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชยน่าจะมีความสัมพันธ์อยู่กับ FW 2 ซึ่งลักษณะ FW 2 นี้พบว่าเป็น framework ที่สัมพันธ์กับยีนบีตาอีโกลบินของประชากรไทยส่วนใหญ่ (Fucharoen G. et.al., 1990) และลักษณะของ FW 3 ที่ปรากฏอาจจะมาจากประชากรที่มีความสัมพันธ์กับประชากรดั้งเดิมหลังจากการอพยพย้ายถิ่นฐาน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรม โดยลักษณะ FW 3 ที่พบน่าจะเป็นลักษณะ FW 3 ที่พบในประชากรเชื้อสายเขมร ที่เชื่อว่าเป็นประชากรดั้งเดิมของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นยีนบีตาอีโกลบินที่มีต้นกำเนิดต่างจากยีนบีตาอีโกลบิน FW 2 (Antonarakis et al., 1982 b) ในประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ ต. รัษฎา อ.เมือง จ. ภูเก็ต จำนวน 7 โครโมโซม พบโครโมโซมบีตาอีโกลบินสัมพันธ์อยู่กับ FW 2 7 โครโมโซม แนวโน้มของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่กลุ่มนี้น่ามีความสัมพันธ์อยู่กับ FW 2 ซึ่งลักษณะ FW 2 นี้พบว่าเป็น framework ที่สัมพันธ์กับยีนบีตาอีโกลบินของประชากรไทยส่วนใหญ่

ดังนั้นจากการศึกษา DNA framework ของยีนบีตาอีโกลบินในกลุ่มชาวน้ำทั้ง 2 กลุ่ม ทำให้เชื่อว่าลักษณะ FW 2 และ FW 3 ที่พบอาจจะเป็นลักษณะของชาวน้ำเองก็ได้หรืออาจมีการแต่งงานกับคนพื้นเมืองหรือชนเผ่าอื่นในบริเวณนั้นและในประชากรชาวน้ำนั้น มียีนบีตาอีส่วนใหญ่ที่ตรวจพบอยู่บนโครโมโซมชนิด FW 2 และ FW 3 ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้บ่อยในคนไทย ชอง เขมร ยุโรป และโส้ แสดงให้เห็นว่ายีนบีตาอีโกลบิน ในประชากรชาวน้ำ มีต้นกำเนิดเดียวกันกับคนไทย ชอง เขมร ยุโรป และโส้ โดยเฉพาะคนไทย และยังพบชนิด FW 3 ซึ่งพบได้ใน ชอง เขมร ไทย ได้เช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 6.1

ตารางแสดง 6.1 แสดงผลการศึกษา β^E-globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำเปรียบเทียบกับชนกลุ่มอื่นที่มีรายงานไว้ได้แก่ ในคนไทยและเขมร (Hundrieserและคณะ, 1988a,b) ในคนยุโรป (Kazazian, และคณะ, 1984) ในชาวโส้ (Yongvanit และคณะ, 1989) และซาไกและชาวชอง (เยาวลักษณ์ วิไล, 1995)

β^E-frameworks	AvaII polymorphism	BamHI polymorphism	number of chromosomes						
			ชาวน้ำ	ซาไก	ชอง	เขมร	ไทย	ยุโรป	โส้
1	+/+	+/+	-	-	1	-	1	1	-
2	+/-	+/-	10	-	2	16	67	1	35
2/3	+/-	+/-	-	1	4	-	-	-	-
3	-/-	+/+	1	-	50	34	1	-	-
	รวม		11	1	57	50	69	2	35

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก เยาวลักษณ์ วิไล 1995

2.2 การศึกษาดีเอ็นเอเฟรมเวิร์คของยีนบีตาเอโกลบิน

จากการศึกษาดีเอ็นเอ FW ของยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชย ต.ไม้ขาว อ. ถลาง จ. ภูเก็ต พบว่ายีนบีตาเอโกลบินมีลักษณะ FW 1 4 โครโมโซม FW 2 29 โครโมโซม FW 3 53 โครโมโซม แนวโน้มของยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชยน่าจะมีความสัมพันธ์อยู่กับ FW 3 ซึ่งลักษณะ FWที่พบนี้พบว่าเป็น FW ที่สัมพันธ์กับยีนบีตาเอโกลบินของประชากรไทยส่วนใหญ่ เชื่อว่าเป็นประชากรดั้งเดิมของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดีเอ็นเอ FW ของยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ ต. รัษฎา อ.เมือง จ. ภูเก็ต พบว่ายีนบีตาเอโกลบินมีลักษณะ FW 1 4 โครโมโซม FW 2 32 โครโมโซม FW 3 38 โครโมโซม แนวโน้มของยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ ต. รัษฎา อ.เมือง จ. ภูเก็ต น่าจะมีความสัมพันธ์อยู่กับ FW 3 ซึ่งลักษณะ FWที่พบนี้พบว่าเป็น FW ที่สัมพันธ์กับยีนบีตาเอโกลบินของประชากรไทยส่วนใหญ่ เชื่อว่าเป็นประชากรดั้งเดิมของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

จากการศึกษาดีเอ็นเอ FW ของยีนบีตาเอโกลบินในกลุ่มชาวน้ำทั้ง 2 กลุ่ม ทำให้เชื่อว่าน่าจะสัมพันธ์กับลักษณะ FW 3 ซึ่งเป็น FW ลักษณะเฉพาะของชาวน้ำเองทั้ง 2 กลุ่ม ส่วน FW 1 หรือ FW 2 ก็จะเป็นลักษณะที่พบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประชากรชาวน้ำนั้นมียีนบีเอส่วนใหญ่ที่ตรวจพบอยู่บนโครโมโซมชนิด FW1 FW 2 และ FW 3 ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้บ่อยในคนไทยทางตอนเหนือ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คนภูเขา ภูไท ชอง ซาไก และลาวโซ่ง แสดงให้เห็นว่ายีนบีตาเอโกลบิน ในประชากรชาวน้ำ มีต้นกำเนิดเดียวกันกับ คนไทยทางตอนเหนือ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คนภูเขา ภูไท ชอง ซาไก และลาวโซ่ง ดังตารางที่ 6.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6.2 แสดงผลการศึกษา β^A-globin gene frameworks ในประชากรชาวน้ำเทียบกับชนกลุ่มน้อยต่างๆในประเทศไทย

β^A-frameworks	จำนวนโครโมโซม							
	ชาวน้ำ	เหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ชาวเขา	ภูไท	ชอง	ซาไก	ลาวโซ่ง
1	8	10	11	14	7	3	10	12
2	61	9	8	62	28	6	29	33
3	91	18	8	72	8	30	22	66
จำนวนโครโมโซมทั้งหมด	160	37	27	148	43	39	61	111

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Fucharoen และคณะ 1997

2.3 การศึกษาดีเอ็นเอแฮปโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาอีโกลบินในชาวน้ำ จ. ภูเก็ต

จากการศึกษา DNA polymorphisms หรือ DNA haploypes ของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน ที่สัมพันธ์กับยีนบีตาอีโกลบิน ในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่ามีแฮปโพลไทป์ไม่ต่ำกว่า 8 รูปแบบ (Antonarakis และคณะ , 1982 b)

Antonarakis (1982 b) ได้รายงานลักษณะแฮปโพลไทป์ ในคนไทย ลาว และ เขมร มี 3 รูปแบบคือแบบ $-+-++\beta^E+-$ แบบ $+---\beta^E+-$ และแบบ $-+-++\beta^E-+$

Nakatsuiji และคณะ (1986) พบแฮปโพลไทป์ของชาวเวียตนาม เป็นแบบ +----β^E-+ Hundrieser และคณะ (1988 a,b) ชาวอัสสัม ในประเทศอินเดีย เป็นแบบ -++++β^E+- ในคนภาคเหนือของประเทศไทยและคนเขมร เป็นแบบ ---++β^E+- และแบบ -+++-+β^E+- ส่วนในชาวเขมร เป็นแบบ +-++β^E-+ และแบบ +----β^E-+ (Antonarakis และคณะ , 1982 b ; Hundrieser และคณะ (1988 a) ชาวอินโดนีเซียเป็นแบบ +----β^E++ และแบบ -+-++β^E++ (L.E.Lie – Injo และคณะ, 1989)

จากการศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย พบลักษณะแฮปโพลไทป์ แบบ +----β^E+- หรือแบบ -+-++β^E+- ซึ่งเป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ที่สามารถพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งน่าจะมาจากการแต่งงานข้ามกลุ่มกันและยังพบ แบบ +-++β^E-+ ซึ่งเป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ ที่พบได้ในชาวเขมร แสดงให้เห็นว่าคนเชื้อสายชาวเขมรได้เข้ามาแต่งงานกับชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชย

ส่วนในประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ พบลักษณะแฮปโพลไทป์ เป็นแบบ +----β^E+- หรือ แบบ -+-++β^E+- ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบได้ในประชากรไทยซึ่งน่าจะมาจากการแต่งงานระหว่างชาวน้ำกับคนพื้นเมือง

โดยพบว่ายีนบีตาอีมี chromosome background เหมือนในคนไทยเป็นแบบ -+-++β^E+- คนลาว +----β^E+- ลาวโซ่ง +----β^E+- และแบบ -+-++β^E+- และชาวโส้ แบบ +---β^E+- และแบบ -+-++β^E+- แสดงว่าชาวน้ำมีต้นกำเนิดของยีนบีตาอีร่วมกันกับกลุ่มชาติพันธุ์ไทย ลาว ลาวโซ่ง และโส้ แสดงไว้ใน ตารางที่ 6.2

สำหรับประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน มีลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบิน 3 แบบ คือ แบบ +----β^E+- หรือแบบ -+-++β^E+- ซึ่งเป็นชนิด FW 2 น่าจะมาจากคนไทยโดยการแต่งงานข้ามกลุ่ม และแบบ -+-++β^E-+ ซึ่งเป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ ที่พบได้ในชาวเขมร แสดงให้เห็นว่าคนเชื้อสายชาวเขมรได้เข้ามาแต่งงานกับชาวน้ำ การพบ β^E – globin gene FW ในชาวน้ำมากกว่า 1 ชนิด แสดงว่ายีนบีตาอีโกลบินในชาวน้ำมีอย่างน้อย 2 ต้นกำเนิด

ตารางที่ ~~6.2~~ 6-3 แสดงผลการศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในประชากรชาวน้ำเปรียบเทียบกับชนกลุ่มต่างๆในประเทศไทย

แฮปโพลไทป์	FW	number of chromosomes							
		ชาวน้ำ	เหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ	คนภูเขา	ภูไท	ชอง	ซาไก	ลาวโซ่ง
(+ - - - - + -)*	2	10	1	2	2	5	1	3	2
(- + - + + + -)*	2		2	8	-	13	7	-	2
(+ - - - - - +)	3	-	-	-	-	1	6	-	-
(- + - + + + - +)**	3	1	-	3	-	-	38	-	-
(- + - - - - +)	3	-	-	-	-	-	7	-	-
	Total	**11**	**3**	**13**	**2**	**19**	**59**	**3**	**4**

หมายเหตุ * และ ** เป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ที่พบได้เสมอในประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประชากรชาวเขมร ตามลำดับ

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Fucharoen และคณะ 1997

2.4 การศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอ (β^A – globin gene haplotypes)ในชาวน้ำ จ. ภูเก็ต

เมื่อศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอ (β^A – globin gene haplotypes)ในชาวน้ำพบว่ามี FW 2 ชนิด คือ FW 2 ซึ่งมีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - - β^A+ - หรือ - + - + + β^A+ - ซึ่งเป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาเอที่พบได้ในทางตอนเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ คนภูเขา ภูไท ชอง ซาไก ลาวโซ่ง และ FW 3 มีแฮปโพลไทป์เป็นแบบ - + - + + β^A - + เป็นลักษณะแฮปโพลไทป์ที่พบได้ ในตะวันออกเฉียงเหนือและชาวชอง

ตารางที่ 6.4 แสดงผลการศึกษาแฮปโพไทป์ของยีนบีตาเอโกลบินในประชากรชาวน้ำเปรียบเทียบกับชนกลุ่มต่างๆในประเทศไทย

Haplotype	Frameworks (FW)	number of chromosomes							
		Chaonam	North	North east	Hill tribes	Phu Tai	Chong	Sakai	Lao Song
(+-----++)	1	-	7	8	10	5	-	-	8
(-++--+++)	1	-	1	-	-	1	2	-	4
(-+-++++)	1	-	2	3	4	1	1	10	-
(+----+-)	2	๑	1	2	2	5	1	3	2
(-++-++-)	2	-	-	-	-	-	-	-	3
(-+-+++-)	2	-	1	-	9	1	4	3	4
(+-----+)	3	5	13	8	53	5	24	4	58
(-++-+-+)	3	6	3	-	6	1	-	-	1
(-+-+++-+)	3	-	1	-	8	1	2	16	7
(-+--+-+)	3	-	1	-	3	1	4	1	-
(-+----+)	3	-	-	-	2	-	-	1	-
	Total	๒๐	37	27	148	43	39	61	111

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Fucharoen และคณะ 1997

3. การศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในชาวน้ำ

จากการศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน ทั้ง 3 แบบ คือ แบบ - - SEA แบบ rightward deletion และแบบ leftward deletion ในประชากรชาวน้ำ เพื่อใช้เป็น genetic marker ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มชาติพันธุ์ พบว่าในประชากรชาวน้ำ บ้านท่าฉัตรไชยและเกาะสิเหร่ ไม่พบรูปแบบการขาดหายไปแบบ Southeast Asian Type (- - SEA) และแบบ leftward deletion

แต่พบว่าในประชากรชาวน้ำบ้านท่าฉัตรไชย พบรูปแบบการขาดหายไปของแอลฟาโกลบินยีนแบบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) จำนวน 3 ราย จากประชากรชาวน้ำทั้งหมด 22 ราย ความถี่ยีน ($-\alpha^{3.7}$) = 0.07 แต่ไม่พบแบบ leftward deletion

ส่วนในชาวน้ำที่เกาะสิเหร่ พบรูปแบบการขาดหายไปของแอลฟาโกลบินยีนแบบ rightward deletion จำนวน 3 ราย จากประชากรชาวน้ำทั้งหมด 17 ราย ความถี่ยีน ($-\alpha^{3.7}$) = 0.09 แต่ไม่พบ แบบ leftward deletion

การขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletion ในประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้าน พบจำนวน 6 ราย ความถี่ยีน = 0.089 และ ไม่พบแบบ leftward deletion

Prembrey และคณะ (1975) ได้รายงานว่าการพบยีนแอลฟาธาลัสซีเมียสูง เชื่อว่าเป็นผลมาจาก 1) isolation 2) intense inbreeding และ 3) natural selection แต่จากผลการศึกษาประชากรชาวน้ำครั้งนี้ พบ α^{+}- thalassemia แบบ rightward deletion ค่อนข้างน้อยแสดงว่าแสดงว่าชาวน้ำที่ศึกษาไม่ได้มีคุณสมบัติตามที่ Prembrey และคณะได้กล่าวไว้ ส่วนการพบ rightward deletion แต่ไม่พบ leftward deletion ในประชากรชาวน้ำ อาจเป็นสาเหตุจาก บริเวณ z box และ x box ซึ่งเป็นบริเวณที่จะเกิดปรากฏการณ์ crossing over มีพื้นที่แตกต่างกันโดย z box มีขนาดพื้นที่ประมาณ 2.1 กิโลเบส จะเกิด crossing over ง่ายกว่า x box ซึ่งมีพื้นที่เพียง 0.4 กิโลเบส จึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ พบ rightward deletion ($-\alpha^{3.7}$) ได้ง่ายกว่า leftward delation ($-\alpha^{4.2}$) (Trent และคณะ ,1981) และในขณะเดียวกัน rightward deletion อาจมี selective adventage ต่อเชื้อมาลาเรียมากกว่า แบบ leftward deletion

ตารางที่ 6.5 เปรียบเทียบ % รูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบต่างๆในชาวน้ำกับชนเผ่าต่างๆ

Type of α-globin deletion	Incidence in various groups (%)					
	Chaonam	South East Asia (Chinese)	Thai (North)	Egypt	Mardang	Papua New guinea
- - SEA	พบบ่อย (Huang และคณะ, 1988)	5-12 % (Hundrieserและคณะ, 1988)	-	- -	-	-
rightward	-	-	พบมาก	-	-	15.38% (present)
leftward	-	-	พบน้อย (Novelleto และคณะ, 1989)	95.9% (Novelleto และคณะ, 1989)	> 80% (Yenchitsomanus และคณะ, 1986)	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

1. ในการตรวจสอบชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธีเซลลูโลสอะซิเตทอิเลคโตรโฟเรซีส ในประชากรชาวน้ำ ที่อาศัยอยู่ในที่บ้านท่าฉัตรไชย ตำบลไม้ขาว อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต จำนวน 64 ราย ตรวจพบฮีโมโกลบินอี ชนิดเฮทเตอโรไซโกต จำนวน 4 ราย ความถี่ยีนบีตาอี = 0.031 และชาวน้ำที่อาศัยอยู่ในเกาะสิเหร่ ตำบลรัษฎา อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต จำนวน 65 ราย ตรวจพบฮีโมโกลบินอี ชนิดเฮทเตอโรไซโกต จำนวน 7 ราย ความถี่ยีนบีตาอี = 0.054

สำหรับผลการตรวจสอบชนิดฮีโมโกลบินในประชากรชาวน้ำ ทั้ง 2 หมู่บ้าน จำนวน 129 ราย ตรวจพบฮีโมโกลบินอี ชนิดเฮทเตอโรไซโกต จำนวน 11 ราย ความถี่ยีนบีตาอี = 0.043 ราย

2. เมื่อศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตาอีโกลบิน โดยวิธีพีซีอาร์ และ เอ็นไซม์ตัดจำเพาะพบว่า

2.1 ในประชากรชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชยพบยีนบีตาอี 4 โครโมโซม ชนิด FW2 ที่มี แฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - -β^E + - หรือ - + - + + β^E + - แสดงว่ายีนบีตาอีในประชากรชาวน้ำที่บ้านท่าฉัตรไชยมีต้นกำเนิดเดียวกันกับ คนไทย, คนลาว, ภูไท, ลาวโซ่ง และโส้ และชนิด FW3 โดยมีแฮปโพลไทป์ เป็นแบบ - + - + + β^E - + ซึ่งเป็นยีนบีตาอีที่พบได้ในชาวเขมร แสดงว่ามีการแต่งงานระหว่างคนที่มีเชื้อสายชาวเขมรกับชาวน้ำ

2.2 ประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่พบยีนบีตาอี 7 โครโมโซม ชนิด FW2 ที่มี แฮปโพลไทป์เป็นแบบ + - - - -β^E + - หรือ - + - + + β^E + - แสดงว่ายีนบีตาอีในประชากรชาวน้ำที่เกาะสิเหร่มีต้นกำเนิดเดียวกันกับ คนไทย, คนลาว, ภูไท, ลาวโซ่ง และโส้

ประชากรชาวน้ำทั้ง 2 หมู่บ้านมีลักษณะของ Framework ที่พบเป็น FW 2 เหมือนกันแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และการมีต้นกำเนิดเดียวกัน ซึ่งพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จึงบอกได้ว่ายีนบีตาอีในชนกลุ่มชาวน้ำมีต้นกำเนิดเดียวกันกับชนในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

3. เมื่อศึกษารูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน ทั้ง 3 แบบ คือแบบ Southeast Asian Type (- -SEA) แบบ rightward deletion และ leftward deletion ในประชากรชาวน้ำพบว่า

3.1 ไม่พบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ (- - SEA)

3.2 พบความถี่รูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน แบบ rightward deletion = 0.089

3.3 ไม่พบรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินแบบ leftward deletion

4. จากข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทำวิจัยครั้งนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลทางสาธารณะสุข เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาคุณภาพชีวิตต่อไปในอนาคต

5. การศึกษาครั้งนี้อาศัยเทคนิคพีซีอาร์ และ Southern blot ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง ดังนั้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้จะต้องมีความบริสุทธิ์และมีปริมาณมากพอ ซึ่งในขั้นตอนของการทำ Southern blot ต้องใช้ดีเอ็นเอในปริมาณมาก

6. การศึกษาทุกครั้งจะต้องระมัดระวังให้มาก โดยเฉพาะความสะอาด และควรมี control ด้วยทุกครั้ง เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอม (false-positive)

7. สถานที่ที่ต้องออกไปเก็บตัวอย่างเลือดชาวน้ำต้องใช้เวลาในการเดินทางระยะทางไกลมากและเสี่ยงต่ออันตราย

8. สถานที่ในการเก็บตัวอย่างเลือดและสถานที่ในการทำวิจัยค่อนข้างไกลมาก จึงทำให้มีผลต่อคุณภาพของเลือดที่เก็บมาศึกษาคือ ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณน้อย

9. ชาวน้ำมักกลัวเข็มเจาะเลือดซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่ค่อยให้ความร่วมมือเท่าที่ควร โดยเฉพาะพ่อแม่ตัวอย่างเลือดที่ได้จึงได้เด็กของแต่ละครอบครัวเนื่องจากชาวน้ำมีความกลัวในเรื่องโรคเอดส์

10. ชาวน้ำชายส่วนหนึ่งมักไปทำงานนอกบ้านหรือออกไปกับเรือจึงทำให้ตัวอย่างเลือดที่เก็บได้มักจะเป็นเพศหญิง และเด็กเป็นส่วนใหญ่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

บี.อาร์.เฟิร์น. 2515. ประวัติศาสตร์เอเชียอาคเนย์ ม.ร.ว.จีรวัตน์ จักรพันธ์ แปล, โรงพิมพ์สังคมศาสตร์แห่งประเทศไทย: 236 หน้า.

ประเทือง เครือหงส์. 2519. ชาวน้ำ (ชาวทะเล) ในเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์บรรณกิจ. พิมพ์ครั้งที่ 1. 175 หน้า.

ประพนธ์ เรืองณรงค์. 2517. " ชาวน้ำที่เกาะอาดัง " วิทยาสาร 29: 13 (เมษายน) 50 หน้า.

ประยุกต์ ศรีวิไล. 2541. การศึกษาแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินและรูปแบบการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในประชากรชาวกูยในจังหวัดมหาสารคามและสุรินทร์.วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

ประเวศ วะสี. 2521. ธาลัสซีเมีย รายงานการสัมนามหาวิทยาลัยมหิดล เรื่องพันธุศาสตร์กับการพัฒนาประเทศ ณ คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 28 - 40.

เยาวลักษณ์ วิไล. 2538. การศึกษาลักษณะแฮปโพลไทป์ของยีนบีตาอีโกลบินในชาวซองและชาไก. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

สารานุกรมไทยฉบับราชบัณฑิตยสถาน ราชบัณฑิตยสถาน. 2489. เล่ม 7 และเล่ม 10.

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

สุทัศน์ ฟู่เจริญและปราณี ฟู่เจริญ. 2541. ธาลัสซีเมียการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR.โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล. 204 หน้า.

เสมอชัย พูลสุวรรณ 2536. วิวัฒนาการของ beta-globin polymorphism ในประเทศไทย. บทคัดย่อการสัมมนาทางวิชาการครั้งที่ 8 เรื่องพันธุศาสตร์ยุคใหม่ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อุทัย หิรัญโต. 2516. " เรื่องของชาวน้ำ " วารสารกระบี่ 1 (ฉบับปฐมฤกษ์): 48 (มกราคม) 50 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

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

Antonarakis, SE, Boehm CD, Giardina PJV, Kazazian HH Jr. 1982a. Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the β - globin gene cluster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 79: 137 - 141.

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

Chakravarti, A. , Buetow, KH. , Antonarakis. S.E. , Waber, P. G. , Boechm, C. D. , and Kazazian, H. H. Jr. 1978. Non - uniform recombination within the human – globin gene cluster. Am. J. Hum. Genet. 12: 456 - 478.

Embury, S. H. , Miller, J. A. , Dozy, A. M. , Chan, V. and Todd, D. 1980. Two Different Molecular Organizations Account for the Single α- Globin Gene of the α– Thalassemia Genotype. J. clinical Invest. 66: 1319 - 1325.

Flatz, G. , Pik, G. , Sringam, S. 1965. Hemoglobin E and β – thalassemia. Their distribution in Thailand. Ann. Hum. Genet. 29: 151 - 170.

Flint J, Hill AVS, Bowden DK, Oppenheimer SJ, Sill PR, Serjeantson SW, Bana – Koiri J, Bathia K, Alpers MP, Boyce AJ, Weatherall DJ, Clegg JB. 1986. High frequencies of α - thalassemia are the result of natural selection of malaria. Nature 321: 744 – 750.

Flint J, Harding RM. Boyce AJ, Clegg JB.1993. The population genetics of the hemoglobinopathies. Bailliere's Clin. Hematol. 6: 215 - 262.

Fucharen S. Winichagoon P. Thonglairoam V. et al. 1991. Review: Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: experience from 100 pregnancies. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health: 22: 16 - 29.

Fukumaki, Y. and Fucharen Sp. 1991. Generation and spread of globin gene mutation in population. New Aspects of the Genetics of Molecular Evolution. Berlin Springer - Verlag 153 - 176.

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

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

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

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

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

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

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

Kulozik AE, Kar CC, Serjeant BE, Weatherall DJ. 1988. The molecular basis of α thalassemia in India. Its interaction with sickle cell gene. Blood 71: 467.

Lawn, R. M. Fritsch, E. F. , Parker, R. C. , Blake, G. and Maniatis, T. 1978. The isolation and characterization of linked δ - and β-globin genes from a cloned library of human DNA. Cell 15: 1157 - 1170.

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

L. E. Lie – injo, et al. 1989. β - Thalassemia mutation in Indonesia and their linkage to β haplotypes. Am. J. Hum. Genet. 45: 971 – 975.

Maniatis, T. , et al. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15: 687 - 701.

Na – Nakorn and S. 1978. The distribution of Hb E; Hb E triangle in Southeast Asia. J. Med. Ass. Thai. 61: 65.

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

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

Orkin, S. H. and Goff, S. C. , 1981. The duplicated human α-globin gene their relative expression as measured by RNA analysis. Cell. 24: 345 - 349.

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

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

Okin, S. H. , Kazazian, H. H. Jr. , Antonarakis, S. E. , Ostear, H. , Goff, S. C. , Sexton, T. P. 1984. Abnormal mRNA processing due to the exon mutation of β^{E}–globin gene. Nature. 300: 768 - 769.

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

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

Pirastu M, Lee KY, Dozy AM, ET AL. 1982. Alpha – thalassemia in two Mediterranean populations. Blood 60: 509 – 512.

Rienzo, A. D. , Felicetti, L. Noveletto, A. , Colombo, B. , Bianco, I. And Brancati, C. 1988. α – Thalassemia Haplotypes in Italy. Birht Defects 23: 39 - 42.

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

Spense, S.E. , et al. 1982. Five nucleotide changes in the large intervening sequence of β–globin gene in a β – thalassemia patient. Nucleic Acid Res. 10: 1283 - 1290.

Stylianos E. Antonarakis, Stuart H. , et al. 1982. Evidence for multiple origins of the β - globin gene in Southeast Asia. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 79: 6608 - 6611.

Saiki, R.K. , et al. 1985. Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science: 1350 – 1354.

Supan fucharoen, Goonnapa fucharoen, Yauwaluk wilai, Phannee chinoluk, Supas khunsuk and Kanokwan sanchisuriya et el. 1997. Beta - Alpha globin gene haplotypes in some minor ethnic group in Thailand. Southeast Asia. Journal of Tropial medicine and PubicHealth 23 Suppl. 3, 115 - 119.

Supan fucharoen, Goonnapa fucharoen, Arunee Jetsrisuparb and Yasuki Fukumaki. 1990. Molecular Basis of β – thalassemia and origin of Hb E in Northeast Thailand identification of one novel mutation using amplified DNA form blood specimens Biochemical and Biophysical Research Communication. 170: 698 - 704.

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

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

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

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

ภาคผนวก

การเตรียมอุปกรณ์

อุปกรณ์ทุกชิ้นทุกขนาดก่อนที่จะทำการทดลองจะต้องทำความสะอาดและทำการล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นน้ำสุดท้าย เครื่องแก้วต้องทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นานถึง 15 นาที

วิธีเตรียมสารเคมี

1. 0.85 NaCl

วิธีเตรียม : ละลาย sodium chloride 8.5 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล.เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Tris-EDTA-borate buffer pH . 8.6

วิธีเตรียม: ละลาย Tris base 10.2 กรัม EDTA (disodium salt) 0.6 กรัม Boric acid 0.32 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล.

3. Ponceau S Staining (0.5 % W/V)

วิธีเตรียม : ละลาย Ponceau S 0.5 กรัม และ Trichloroacetic acid (V/V) 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.

4. Destain solution

ประกอบด้วย : 5% acetic acid

5. Clearing solution

ประกอบด้วย : methanol : glacial acetic acid = 4 : 1

6. 3 % dextran in NSS

วิธีเตรียม : ละลาย dextran 30 กรัม และ sodium chloride 9 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. lysis buffer pH. 7.4

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

8. SE buffer

วิธีเตรียม : ละลาย Na_2EDTA 9.306 กรัม,และะะ sodium chloride 4.383 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล.จนละลายดีแล้วปรับ pH ให้ได้ 7.8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล. นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. 20 % SDS

วิธีเตรียม : ละลาย sodium dodecyl sulphate (SDS) 20 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล.

10. pronase E

วิธีเตรียม : ละลาย pronase E 10 มล. ในน้ำกลั่น 1 มล. เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

11. saturated sodium chloride

วิธีเตรียม : ละลาย sodium chloride 350.66 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 1000 มล. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. ethidium bromide solution

วิธีเตรียม : ethidium bromide solution 30 ไมโครลิตร ใส่ลงใน ddH_2O water 300 มล.

13. partial depurination (0.25โมลาร์ HCl)

วิธีเตรียม : เติม conc. HCl 11 มล. ในน้ำ ddH_2O ให้ครบ 500 มล.

14. alkaline denaturing solution (0.5 โมลาร์ NaOH / 1.5 โมลาร์ NaCl)

วิธีเตรียม : ละลาย NaOH 20 กรัม , NaCl 87.66 กรัมให้เข้ากันแล้ว เติมน้ำ ddH_2O ให้ครบ 1000 มล.

15. neutralizing buffer (0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH 7.5 / 3โมลาร์ NaCl)

วิธีเตรียม : ละลาย Tris- base 60.55 กรัม และ NaCl 175.329 กรัม ให้เข้ากันแล้ว เติมน้ำ ddH_2O ให้ครบ 1,000 มล. ปรับ pH ให้เป็น 7.5

16. prehybridization buffer ปริมาตร 40 มล.

วิธีเตรียม : เติม 20 X SSC(autoclave) 10 มล. , 10% N – Laurylsarcosine 0.4 มล. , 10% SDS 0.08 มล. และ blocking power 0.4 กรัม จากนั้นเติม ddH_20 จนครบ 40 มล.

17. washing 1 (2 X SSC + 0.1 % SDS) ปริมาตร 500 มล.

วิธีเตรียม : เติม 20 X SSC 50 มล. และ 20% SDS 2.5 มล. จากนั้นเติม ddH_20 จนครบ 500 มล.

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

วิธีเตรียม : เติม 20 X SSC 12.5 มล. และ 20% SDS 2.5 มล. จากนั้นเติม ddH_20 จนครบ 500 มล.

19. Buffer 1 (100 มิลลิโมลาร์ Tris + 150 mM NaCl, pH 7.5) ปริมาตร 1,000 มล.

วิธีเตรียม : เติม 1 M Tris, pH 7.5 100 มล. และ 5 M NaCl 30 มล. จากนั้นเติม ddH_20 จนครบ 1,000 มล.

20. Buffer 2 (0.5% blocking powder in buffer 1) 50 มล.

วิธีเตรียม : เติม blocking powder 0.25 กรัม ในbuffer 1 50 มล. นำไปละลายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

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

วิธีเตรียม : เติม Tris – Base 12.11 กรัม, NaCl 5.86 กรัมและ $MgCl_2$ 50 มล. ใน ddH_2O 800 มล. ปรับ pH ให้เป็น 9.5 จากนั้นเติม ddH_2O จนครบ 1,000 มล. นำไป autoclave ก่อนใช้

22. Buffer 4 (10 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 1000 มล.

วิธีเตรียม : เติม 1 M Tris pH 8.0 10 มล.และ 0.5 M EDTA 2 มล.ใน ddH_2O 800 มล. จากนั้นเติม ddH_2O จนครบ 1,000 มล. นำไป autoclave ก่อนใช้

23. 10 X Taq buffer

วิธีเตรียม : ส่วนใหญ่ 10 X Taq buffer จะได้มาพร้อมกับการซื้อ Taq polymerase หรืออาจเตรียมขึ้นได้เองโดยใช้สารประกอบดังนี้

500 มิลลิโมลาร์ KCl

100 มิลลิโมลาร์ Tris-Cl (pH 8.3)

15 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$

0.1 % gelatin

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 เซลเซียส

24. TE buffer

วิธีเตรียม : 10 มิลลิโมลาร์ Tris acetate และ 1 มิลลิโมลาร์ EDTA

25. Gel loading buffer (6X)

วิธีเตรียม : 5% bromophenol

0.25 % xylene cyanol

30 % glycerol in water

26. Color solution

วิธีเตรียม : เติม NBT (vial 10) 50 ไมโครลิตร X – PO4 (vial 10) 50 ไมโครลิตร ใน Buffer 3 15 มล.

27. Antibody solution

วิธีเตรียม : เติม Dig – Ab (vial 8) 4 ไมโครลิตรใน Buffer 2 20 มล.

การเตรียม plasmid DNA probe

1. ถ่ายเชื้อ YF 203 ซึ่งมีโคลนของ α–globin gene อยู่ลงใน BHI broth แล้ว incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

2. นำเชื้อที่เพิ่มจำนวนจาก BHI broth 1-1.5 มล. ถ่ายลงใน microtube ขนาด 1.5 มล.ปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดเอา supernatant ออกให้หมด

3. เติม TEG solution 80 ไมโครลิตร mix ด้วย vortex จนตะกอนหลุดจากก้นหลอดจนหมด

4. เติม lysozyme solution (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ผสมเบาๆแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

5. เติม 0.2 N NaOH/1% SDS 200ไมโครลิตร แล้วผสมโดยกลับหลอด 2-3 ครั้ง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที

6. เติม 5 โมลาร์ KOAc 150ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาแล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นที่ 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 5 นาที ดูดเอาเฉพาะ supernatant ใส่หลอดใหม่

7. เติม phenol 150 ไมโครลิตร และ $CHCl_3$ 150 ไมโครลิตร เขย่า 5 นาที ดูด DNA solution ใส่หลอดใหม่

8. เติม NaOAC 1/10 เท่าของปริมาณ DNA solution

9. เติม 100% ethanol ปริมาตร 2 เท่าของ DNA solution แล้วเก็บที่ – 70 องศาเซลเซียส 15 นาที

10. ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ดูดเอา supernatant ทิ้ง และล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol แล้วดูด 70% ethanol ทิ้งแล้วทำให้ตะกอนแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส จะได้ plasmid DNA pellet

11. ละลาย plasmid DNA pellet ใน TE-buffer 25 ไมโครลิตร ที่มี 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Rnase 1 ไมโครลิตร incubate ที่37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที - 1 ชั่วโมง เพื่อลดปริมาณอาร์เอ็นเอ ตรวจดู plasmid โดยนำ plasmid DNA 2 ไมโครลิตรมาตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis ที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการตรวจคุณสมบัติของ recombinant DNA ที่สกัดได้โดยการใช้เอ็นไซม์ P*st* I

1. นำ recombinant DNA มาเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

Intacted plasmid YE 203	2 ไมโครลิตร
10Xbuffer	1 ไมโครลิตร
H_2O	6 ไมโครลิตร
100 มิลลิโมลาร์ spermidine	0.5 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ P*st* I (10ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.5 ไมโครลิตร

2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง

3. นำไปตรวจสอบใน agarose gel electrophoresis โดย α–globin gene clone เมื่อตัดด้วย P*st* I จะให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 2.7 กิโลเบส และ 1.5 กิโลเบส

ขั้นตอนการตัดและตกตะกอน recombinant DNA ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ E*co*RI ก่อนนำไปเตรียมเป็น Probe

1. นำ recombinant DNA มาตัดด้วยเอ็นไซม์ E*co*RI เติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

Intact plasmid YE 203	30 ไมโครลิตร
10Xbuffer for E*co*RI	10 ไมโครลิตร
100 มิลลิโมลาร์ spermidine	0.5 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ E*co*RI	1.5 ไมโครลิตร

เอ็นไซม์ RNase (0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) 5 ไมโครลิตร

ddH_2O 52.5 ไมโครลิตร

2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

3. ตรวจสอบคุณสมบัติของ recombinant DNA โดย agarose gel electrophoresis ถ้าตัดได้สมบูรณ์จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 4.2 กิโลเบสเพียงชิ้นส่วนเดียว

4. ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติม 0.5 M EDTA 2 ไมโครลิตร ,ddH_2O 100 ไมโครลิตร และเติม $CHCl_3$ 100 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมา นาน 5 นาที

5. นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที ดูด supernatant ใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 มล.

6. เติม 3 โมลาร์ NaOAc 2 ไมโครลิตร และเติม 100% ethanol 440 ไมโครลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

8. ล้างด้วย 70% ethanol ดูด 70% ethanol ออกให้หมด

9. ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน hot air oven นาน 5 นาที

10. ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 16ไมโครลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเตรียม α–globin gene probe

1. นำดีเอ็นเอที่ตกตะกอนแล้วที่ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 16 µl นำมา 5 µl เติมด้วย ddH_2O 5 ไมโครลิตร

2. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แช่ลงในถังน้ำแข็งทันที (quick cool) 5 นาที

3. spin down และเก็บในน้ำแข็งตลอดเวลา

4. เติม primer (vial 5) 2 ไมโครลิตร, dNTP +dig (vial 6) 2 ไมโครลิตร และ Klenow enzyme (vial 7) 1 ไมโครลิตร (Digoxigenin Kit)

5. เขย่าเบาๆให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

6. หยุดปฏิกริยา โดยเติม 0.2 M EDTA 2 ไมโครลิตร และเติม 4 M LiCl 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดน้ำส่วนบนทิ้ง

8. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ดูด 70% ethanol ออกให้หมดทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายด้วย TE-buffer แล้วเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ 2 $^{G}\gamma$- *Hind* III โดยวิธีพีซีอาร์ ใช้โปรแกรม 7 และโปรแกรม 14 ที่อุณหภูมิและเวลาดังนี้

94^0C	3 min	1 cycle
94^0C	1 min	30 cycle
55^0C	1 min	
77^0C	1 min	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนันทวรรณ ชื่นชมคุณาธร เกิดวันที่ 21 มิถุนายน พ.ศ. 2513 ถนนวชิรปราการ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เมื่อปีการศึกษา 2537 ศึกษาต่อหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 จบหลักสูตรในปีการศึกษา 2542 โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิต ในปี พ.ศ. 2542

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย