

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
กระบือปลัก	4
โครงสร้างของอีโมโกลบีน	7
คุณสมบัติของอีโมโกลบีน	11
อุปกรณ์และวิธีการ	26
1. การเก็บตัวอย่างเลือด	26
2. การเตรียมตัวอย่างเลือด	27
3. การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด	27
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	39
1. ฟิโนไทป์ของอีโมโกลบีนกระบือปลัก	39
2. น้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบีนกระบือปลัก	52
สรุป	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	75

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงการแบ่งประเภทของกระป๋องตามหลักภูมิศาสตร์	4
2 แสดงความแตกต่างทางฟิโนไทป์ของกระป๋องปลักและกระป๋องแม่น้ำ	5
3 น้ำหนักโมเลกุลของอีโมโกลบินของกระป๋องปลักแบ่งตามวิธีการศึกษา	63
ตารางผนวกที่	
1 สรุปค่าต่างๆและค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและของอีโมโกลบิน กระป๋องปลัก ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิเดอเรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Sephadex G-100 ด้วย ทริส – ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 อัตราการไหล 1.8 มิลลิลิตรต่อนาที	77
2 การเตรียมสารละลายในหลอด blank และหลอดตัวอย่าง	78
3 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน	78
4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน	79

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	แผนที่แสดงความหนาแน่นของปริมาณกระบือ ในประเทศไทย ปี 2548
2	โครงสร้างของฮีโมโกลบิน
3	Oxygen binding curve ของฮีโมโกลบินและไมโอโกลบิน
4	แสดงผลของ pH, CO ₂ , 2, 3 - BPG และอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของเส้นโค้งของการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบิน
5	แสดงการเปรียบเทียบระหว่างฮีโมโกลบินโคปา ฮีโมโกลบินโคพันธุ์ต่างๆ ฮีโมโกลบินกระบือและฮีโมโกลบินเอของคน
6	แสดงสายโกลบินของโคปา ซึ่งมีอัตราส่วนของสายอัลฟาหนึ่งสายอัลฟาสองต่อสายเบต้าเป็น 1 ต่อ 1 และอัตราส่วนของสายอัลฟาหนึ่งต่อสายอัลฟาสองเป็น 37.5 ต่อ 62.5
7	แสดงฮีโมโกลบินของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาติ) โดยที่ Hb AA ประกอบด้วย Hb slow เพียงอย่างเดียว Hb BB ประกอบด้วย Hb fast เพียงอย่างเดียว ขณะที่ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow
8	แสดงการเปรียบเทียบระหว่างฮีโมโกลบินโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนและกระบือปลักโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2-8.6 (350 โวลต์ 25นาติ) เลนที่ 1 และ 5 แสดง Hb AB ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน เลนที่ 2 3 และ4 แสดง Hb BB Hb AB และHb AB ของกระบือปลักตามลำดับ Hb fast ของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า Hb fast ของกระบือปลัก ในขณะที่ Hb slow ของโคเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเข้าหาขั้วบวกได้เท่ากับ Hb slow ของกระบือปลัก
9	แสดงฮีโมโกลบินของกระบือแม่น้ำ 3 พันธุ์ไทย คือ Hb AA (1) Hb AB (2) และ Hb BB (3) โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแบ่งเจลที่พีเอช 8.9

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
10 แสดงฮีโมโกลบิน 3 ฟีนไทป์ของกระป๋องแม่ น้ำ โดยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งแบบเกรเดียนต์ที่พีเอช 6.5-8.0 (1 = AA 2 = AB และ 3 = BB) * แถบที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้	22
11 แสดงการแยกสายพอลิเปปไทด์จากฮีโมโกลบิน 3 ฟีนไทป์ คือ Hb AA Hb BB และ Hb AB โดยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในช่วงพีเอช 6.8 - 8.5	23
12 แสดงฟีนไทป์ของ Hb BB ในกระป๋องแม่ น้ำ โดยเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งในพีเอชเกรเดียนต์ 7.1 - 7.5 ซึ่งปรากฏ Hb BB ประกอบด้วย Hb 2 และ Hb 4; Hb BB ^S ประกอบด้วย Hb 2, Hb 2 ^S Hb 4 และ Hb 4 ^S ส่วน Hb B ^S B ^S ประกอบด้วย Hb 2 ^S และ Hb 4 ^S	24
13 แสดงฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กเพศเมียช่วงอายุ 1 ปี – 3 ปี โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1, 3, 4, 5 และ 6 แสดง Hb BB เลนที่ 7 และ 8 แสดง Hb AB และเลนที่ 2 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA ₂) ของคน (Helena Laboratories, France)	39
14 แสดงฮีโมโกลบินของกระป๋องปลั๊กเพศเมียช่วงอายุมากกว่า 7 ปี โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซีเตตอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1, 3, 5, 7 และ 8 แสดง Hb BB เลนที่ 2 และ 4 แสดง Hb AB และเลนที่ 6 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA ₂) ของคน (Helena Laboratories, France)	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15 แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักเพศเมียช่วงอายุ 1 ปี – 3 ปี กับ อายุมากกว่า 7 ปี โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1 และ 2 ช่วงอายุมากกว่า 7 ปี แสดง Hb BB และ AB ตามลำดับ เลนที่ 3, 4, 5, 6 และ 8 ช่วงอายุ 1 ปี – 3 ปี แสดง Hb BB และเลนที่ 7 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)	41
16 แสดงฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักเพศผู้ช่วงอายุ 1 ปี - 3 ปี โดยเทคนิค เซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1 แสดง Hb AB เลนที่ 3, 4, 5 , 6, 7 และ 8 แสดง Hb BB และ เลนที่ 2 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)	42
17 แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักเพศผู้และเพศเมียโดยเทคนิค เซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ ฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักเพศเมีย: เลนที่ 1, 3 และ 7 แสดง Hb BB เลนที่ 2 แสดง Hb AB ฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักเพศผู้: เลนที่ 4, 6 และ 8 แสดง Hb BB และเลนที่ 5 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA₂) ของคน (Helena Laboratories, France)	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18	44
แสดงฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่ น้ำพุและผู้และเพศเมียโดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ ฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่ น้ำพุ: เลนที่ 1, 2, 7 และ 8 แสดง Hb BB เลนที่ 6 แสดง Hb AB ฮีโมโกลบินของกระป๋องแม่ น้ำพุเพศเมีย: เลนที่ 3 และ 5 แสดง Hb BB และ Hb AB ตามลำดับ และเลนที่ 4 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA ₂) ของคน (Helena Laboratories, France)	
19	45
แสดงการเปรียบเทียบฮีโมโกลบินของกระป๋องปลักและกระป๋องแม่ น้ำ โดยเทคนิคเซลลูโลสอะซิเตดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่พีเอช 8.2 - 8.6 (350 โวลต์, 25 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ เลนที่ 1 และ 2 แสดง Hb AB เลนที่ 3, 5, 6, 7 และ 8 แสดง Hb BB และเลนที่ 4 แสดง สารละลายมาตรฐาน Hemoglobin control (AFSA ₂) ของคน (Helena Laboratories, France)	
20	46
แสดงชนิดของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักโดยเทคนิคเนทีฟโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 12%T, 4%C ที่พีเอช 8.3 (200 โวลท์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์/เจล 1 แผ่น 40 นาที) Hb BB และ Hb AB ประกอบด้วย Hb fast และ Hb slow ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ	
21	51
แสดงลำดับของกรดอะมิโนในสายอัลฟาทั้ง 4 สายในฮีโมโกลบินกระป๋องแม่ น้ำโดยที่สายอัลฟาหนึ่งหนึ่งและ สายอัลฟาสองสาม ถอดจากรหัสยีน A และสายอัลฟาหนึ่งสองและสายอัลฟาสองสี่ ถอดรหัสจากยีน B แสดงลำดับของกรดอะมิโนในสายอัลฟาทั้ง 4 สายในฮีโมโกลบินกระป๋องแม่ น้ำโดยที่สายอัลฟาหนึ่งหนึ่งและ สายอัลฟาสองสาม พบได้ในยีนส์ A และสายอัลฟาหนึ่งสองและสายอัลฟาสองสี่ พบได้ในยีนส์ B	
22	51
แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนจากยีน A และจากยีน B ในสายอัลฟาของฮีโมโกลบินกระป๋องแม่ น้ำ สายสายอัลฟาหนึ่งหนึ่งและ สายอัลฟาสองสามจากยีน A และสายอัลฟาหนึ่งสองและสายอัลฟาสองสี่จากยีน B	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
23 แสดงผลการชะสสารชนิดต่างๆ ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเทรชันคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Sephadex G-100 ด้วย ทริส – ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 อัตราการไหล 1.8 มิลลิลิตรต่อนาที	52
24 แสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบินกระป๋องปลักจากค่า Kd และ Log M.W. ของโปรตีนต่างๆ	53
25 การหาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก โดยวิธีไซเดียมไดดีซัลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วยเจล 12%T, 4%C (200 โวลท์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์/เจล 1 แผ่น 40 นาที) เลนที่ 1 - 4 และ 6 – 8 คือ สารละลายฮีโมโกลบินกระป๋องปลัก เลนที่ 5 คือ broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)	54
26 การหาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินแม่น้ำโดยวิธีไซเดียมไดดีซัลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่พีเอช 8.3 ด้วยเจล 12%T, 4%C (200 โวลท์คงที่ 60 มิลลิแอมแปร์/เจล 1 แผ่น 40 นาที) เลนที่ 1 - 4 และ 6 – 7 คือ สารละลายฮีโมโกลบินกระป๋องแม่น้ำ เลนที่ 5 คือ broad range M.W. standard (Bio-Rad Laboratory, U.S.A.)	55
27 น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน BB ในกระป๋องปลักแบบ monomer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (BrukerReflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	56
28 น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน BB ในกระป๋องปลักแบบ dimer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	57
29 น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน BB ในกระป๋องปลักแบบ trimer โดยวิธี วิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนพติกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
30	น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน BB ในกระป๋องปลักแบบ tetramer โดยวิธี วิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	59
31	น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน AB ในกระป๋องปลักแบบ monomer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	60
32	น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน AB ในกระป๋องปลักแบบ dimer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	61
33	น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน AB ในกระป๋องปลักแบบ trimer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	62
34	น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมโกลบิน AB ในกระป๋องปลักแบบ tetramer โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แบบ MALDI - TOF (Bruker Reflex IV, Bruker, U.S.A.) ใช้กรดไซแนมิกเป็นเมทริกซ์ และยิงด้วยไนโตรเจนเลเซอร์	63
ภาพผนวกที่		
1	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Hb BB ของกระป๋องปลักแสดงอัตราส่วนระหว่างHb fast ต่อ Hb slow เท่ากับ 2:1	76
2	แสดงพื้นที่ใต้กราฟ Hb AB ของกระป๋องปลักแสดงอัตราส่วนระหว่างHb fast ต่อ Hb slow เท่ากับ 5:1	76
3	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน	79