

การศึกษาแหล่งกำเนิดของอีโมโกลบินเอส อี ซี และคอนสแตนต์สปริง ด้วยการวิเคราะห์แอสโฟลไทป์ของฮีนโกลบิน

วิทยา จอมอยู่^{1,2}, กุลนภา ฟูเจริญ^{2*}, สุพรรณ ฟูเจริญ²

Received: May 21, 2014

Revised & Accepted: June 19, 2014

บทคัดย่อ

แอสโฟลไทป์เป็นลักษณะภูมิหลังของโครโมโซมประกอบขึ้นจากรูปแบบของดีเอ็นเอโพลีเมอร์ฟิสม มีประโยชน์ต่อการศึกษาถึงแหล่งกำเนิดและความสัมพันธ์ในเชิงประชากรพันธุศาสตร์ ในบทความนี้ได้รวบรวมข้อมูลแอสโฟลไทป์ที่สัมพันธ์กับอีโมโกลบินผิดปกติที่ตรวจพบในคนไทย ประกอบด้วย อีโมโกลบินเอส, อีโมโกลบินอี, อีโมโกลบินซี, และอีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในกลุ่มชนอื่น เพื่อศึกษาต้นกำเนิดของอีโมโกลบินผิดปกติเหล่านี้ โดยการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ จากบทความที่ได้รับการตีพิมพ์จำนวนทั้งสิ้น 33 บทความ ประกอบด้วย อีโมโกลบินเอส 24 บทความ อีโมโกลบินอี 3 บทความ อีโมโกลบินซี 4 บทความ และอีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง 2 บทความ พบว่าอีโมโกลบินเอสสัมพันธ์กับแอสโฟลไทป์อย่างน้อย 5 รูปแบบ มี 4 รูปแบบที่พบบ่อยในแถบแอฟริกาและเมดิเตอร์เรเนียน อีกหนึ่งรูปแบบพบเฉพาะในเอเชีย สำหรับอีโมโกลบินอี พบว่ามีอย่างน้อย 2 แหล่งกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แบบแรกสัมพันธ์กับประชากรที่อาศัยอยู่บริเวณตอนเหนือและตอนกลางของแม่น้ำโขง อีกชนิดหนึ่งสัมพันธ์กับบริเวณตอนใต้แม่น้ำโขง และประเทศกัมพูชา สำหรับอีโมโกลบินซีนั้นส่วนใหญ่ที่พบทั่วโลกมีแหล่งกำเนิดจากแอฟริกา แต่ที่พบในคนไทยทั้งหมดมีแอสโฟลไทป์ต่างจากแอฟริกาซึ่งน่าจะแสดงถึงแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน สำหรับอีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงพบอย่างน้อย 2 แหล่งกำเนิด รูปแบบแรกพบได้บ่อยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จนถึงตอนใต้ของประเทศจีน อีกรูปแบบหนึ่งพบน้อยกว่าโดยมีรายงานตรวจพบในแถบเมดิเตอร์เรเนียน ข้อมูลเหล่านี้เป็นความรู้พื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาด้านประชากรพันธุศาสตร์ของอีโมโกลบินได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: อีโมโกลบินผิดปกติ, โกลบินฮีนแอสโฟลไทป์, แหล่งกำเนิดฮีน, ประชากรพันธุศาสตร์

¹หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (สวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Study on the origins of hemoglobins S, E, C and Constant Spring by globin gene haplotype analysis

Wittaya Jomoui^{1,2}, Goonnapa Fucharoen^{2*}, Supan Fucharoen²

Abstract

Haplotypes are the patterns of chromosome background constructed from multiple DNA polymorphisms along the chromosome. They are especially useful for studying of genetic origin of mutation and ethnic relationship. In this paper, globin gene haplotypes associated with common hemoglobin (Hb) variants in multiple populations were summarized from a total of 33 published articles including Hb S (24 articles), Hb C (4 articles), Hb E (3 articles) and Hb Constant Spring (2 articles). Data were accumulated for predicting origins of the corresponding mutations and determining ethnic relationship. The results showed that at least five common haplotypes were associated with Hb S; 4 of which were found mainly in Africa and Mediterranean. The remaining haplotype, found only in Asia represented different origin. Two dominant origins were found for the Hb E in Southeast Asia i.e. one in the Northern and Central areas along Mekong river basin and another was associated with those living in the southern part of Mekong river and Cambodia. Hb C had at least 2 origins; an African origin found in American black, West African and Sicilian and non African origin found only in Asia. Haplotype analysis also indicated multiple origins of Hb Constant Spring gene; a more common Asian origin found in Southeast Asian and Chinese and a rarer origin of Mediterranean. Basic knowledge of chromosome background of these common Hb variants are very useful for population genetic study of Hb variants in world population.

Keywords : Abnormal hemoglobin, Globin gene haplotype, Genetic origin, Population genetics

¹Biomedical Science Program, Graduate School, Khon Kaen University

²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories,
Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

* Corresponding author: (e-mail: goonnapa@kku.ac.th)

บทนำ

แฮพโลไทป์ (haplotype) เป็นลักษณะภูมิหลังของโครโมโซมประกอบขึ้นจากรูปแบบพหุสัณฐานของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) หลายๆจุดที่เรียงอยู่ใกล้กันภายในโครโมโซมเดียวกัน เนื่องจากเรียงตัวอยู่ใกล้กันจึงถูกถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวเป็นชุดไปยังบุตรหลานได้ตามหลักพันธุศาสตร์ ข้อมูลแฮพโลไทป์จึงสามารถระบุถึงภูมิหลังโครโมโซมที่ถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่งได้ DNA polymorphism ที่พบบ่อยและมีความหลากหลายในประชากรและมีความถี่ของการตรวจพบมากกว่าร้อยละ 1 ส่วนใหญ่เป็นชนิด single nucleotide polymorphism (SNP) การศึกษาลักษณะแฮพโลไทป์ที่สัมพันธ์กับยีนต่างๆจึงมีประโยชน์ต่อการศึกษถึงความสัมพันธ์ระหว่างประชากรด้านพันธุศาสตร์⁽¹⁾

สำหรับการศึกษา DNA polymorphism ที่สัมพันธ์กับฮีโมโกลบินผิดปกติ นิยมศึกษาด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่ง DNA polymorphism ที่อยู่ภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบินบนโครโมโซมที่ 11 นั้นมีมากกว่า 60 ตำแหน่ง แต่ที่นิยมใช้ในการศึกษามีประมาณ 7-8 ตำแหน่ง ที่มีลักษณะการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์เป็นแบบ linkage disequilibrium โดยแบ่งเป็นสองส่วน คือ 5' haplotype ประกอบด้วย DNA polymorphism 5 ตำแหน่ง ได้แก่ *Hinc* II บริเวณ 5' ϵ -globin gene, *Hind* III ใน γ - globin gene, *Hind* III ใน α - globin gene, *Hinc* II ใน $\psi\beta$ - globin gene และบริเวณ 3'- $\psi\beta$ - globin gene ส่วน 3' haplotype ประกอบด้วย *Ava* II ใน β - globin gene และ *Bam* H I บริเวณ 3' β - globin gene โดยในส่วน 3' haplotype นั้น สามารถจัดรูปแบบการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ได้เป็น 3 รูปแบบ คือ framework 1 (*Ava* II +, *Bam* H I +), framework 2 (*Ava* II +, *Bam* H I -) และ framework 3 (*Ava* II -, *Bam* H I +) และไม่พบรูปแบบ (*Ava* II -, *Bam* H I -) ในประชากรใดในโลก⁽²⁾ ส่วน polymorphism ภายในกลุ่มยีน α -globin ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 16 นั้น ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษา ประกอบด้วยอย่างน้อย 17 ตำแหน่ง และมี 9 ตำแหน่งที่ถูกนำไปใช้ในการกำหนดแฮพโลไทป์ของ α -globin gene cluster ซึ่งประกอบด้วย RFLP 7 ตำแหน่ง (5' *Xba*I, *Sac*I, *Bgl*II, *Acc*I, *Rsa*I, *Pst*I, *Pst*I 3') และ length polymorphism 2 ตำแหน่ง (Interzeta HVR และ Pseudozeta HVR)^(3, 4)

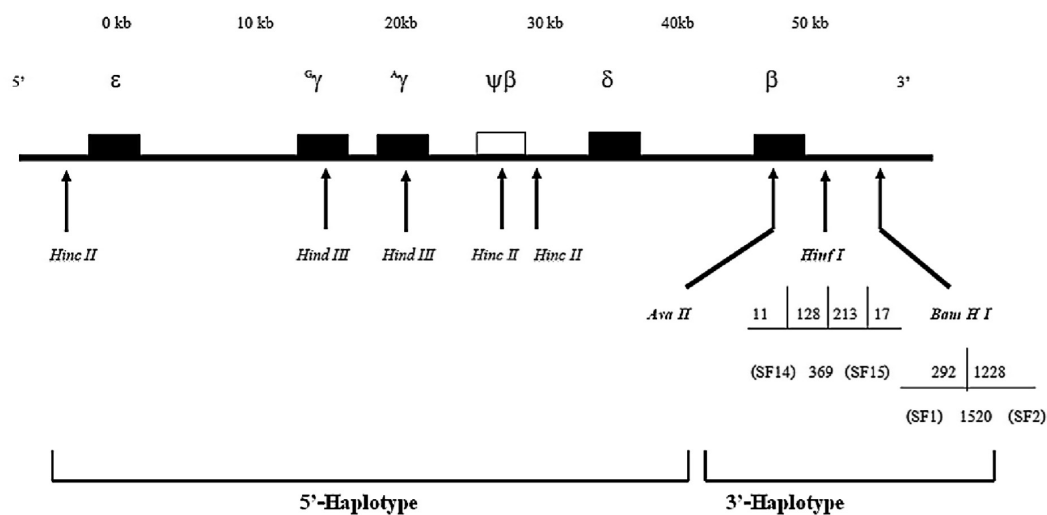
ฮีโมโกลบินผิดปกติเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนโกลบินที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนในการสังเคราะห์สายโกลบิน ทำให้เกิดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ มีหลายชนิดและมีรายงานตรวจพบได้ทั่วโลก มีทั้งชนิดที่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกและไม่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิก การตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติจึงมีความสำคัญ⁽⁵⁾ ชนิดที่มีรายงานตรวจพบได้บ่อยในประชากร ได้แก่ Hb S, Hb E และ Hb C ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบิน ส่วนที่เป็นผลจากการกลายพันธุ์ของยีนอัลฟาโกลบิน ที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และได้รับการศึกษา คือ Hb Constant Spring⁽⁶⁻⁹⁾ บทความนี้ ได้รวบรวมข้อมูลแฮพโลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งสี่ชนิดนี้ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านประชากรพันธุศาสตร์ต่อไป

วิธีการศึกษา

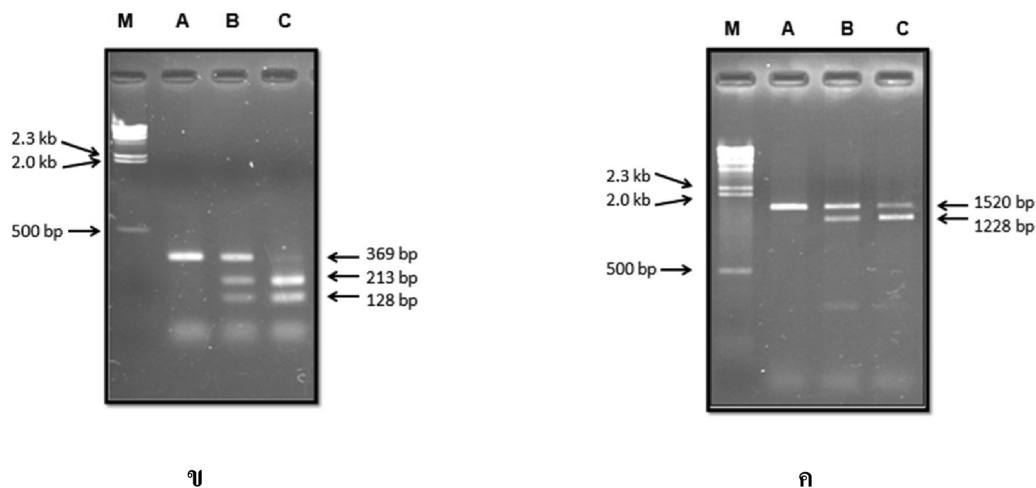
ศึกษาจากการทบทวนวรรณกรรมนิพนธ์ต้นฉบับ โดยดำเนินการเป็นขั้นตอนประกอบด้วย การกำหนดหัวข้อการทบทวนวรรณกรรม คือ ฮีโมโกลบินผิดปกติ กำหนดวัตถุประสงค์ของการทบทวนวรรณกรรมและคัดเลือกข้อมูลวรรณกรรม ฐานข้อมูลหลักที่ใช้ คือ PubMed ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสากลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทางการแพทย์ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) รวมถึงวรรณกรรมที่ไม่ได้ตีพิมพ์ และวิทยานิพนธ์ โดยกำหนดคำสำคัญเป็น haplotype, hemoglobin S (Hb S), hemoglobin C (Hb C), hemoglobin E (Hb E) และ hemoglobin Constant Spring (Hb CS) กำหนดเกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) คือ การวิเคราะห์แฮพโลไทป์ของยีนฮีโมโกลบินเอส, อี, ซี และคอนสแตนท์สปริง ส่วนเกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ได้แก่ บทความทบทวนวรรณกรรมและบทความที่มีข้อมูลแฮพโลไทป์ที่ไม่ครบถ้วน นำข้อมูลในบทความที่คัดเลือกได้มาวิเคราะห์ แปลผลและสรุปผล พร้อมทั้งแสดงตัวอย่างการศึกษา DNA polymorphism ด้วย *Hinf* I polymorphism บริเวณ 3' ของยีนบีตาโกลบินซึ่งใช้แทนการศึกษา *Bam* H I ในบริเวณ 3' β - globin gene เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่อยู่ใน L1 repetitive sequence ทำให้มักมี non specific fragment จำนวนมากและยากต่อการแปลผลการตรวจ เนื่องจาก *Hinf* I polymorphism ตั้งอยู่นอก L1 repetitive sequence ทำให้ศึกษาได้ง่ายกว่าและจากการศึกษา

ในหลายกลุ่มประชากร พบว่าแสดงลักษณะการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์แบบ linkage disequilibrium กับ *BamH* I polymorphism⁽¹⁰⁾ จึงนำมาใช้ศึกษาแทนกันได้ โดยเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ *Hinf* I polymorphism ด้วยไพรเมอร์ SF14 (5'-TCCCTCAGAAAAGGATTCAA-3') และ SF15 (5'-GGAATCTGCAGTGCTAGTC-3') ได้ชิ้นส่วนขนาด 369 bp จากนั้นจึงนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I หากสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Hinf* I (+) จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 11, 128, 213 และ 17 bp แต่ถ้ามี polymorphism เป็นชนิด

Hinf I (-) จะพบแถบดีเอ็นเอแถบเดียว คือ 369 bp ส่วนการศึกษา *BamH* I polymorphism บริเวณ 3'β - globin gene ใช้ไพรเมอร์ SF1 (5'-GCCCACATCACCAAG-GCAAT-3') และ SF2 (5'-GCTCTACGGATGTGT-GAGAT-3')⁽¹¹⁾ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขนาด 1,520 bp แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *BamH* I ถ้าสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *BamH* I (+) จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 1228 และ 292 bp หากเป็นชนิดที่ตัดไม่ได้ *BamH* I (-) จะพบแถบดีเอ็นเอแถบเดียว คือ 1,520 bp ดังแสดงใน **รูปที่ 1**



ก



ข

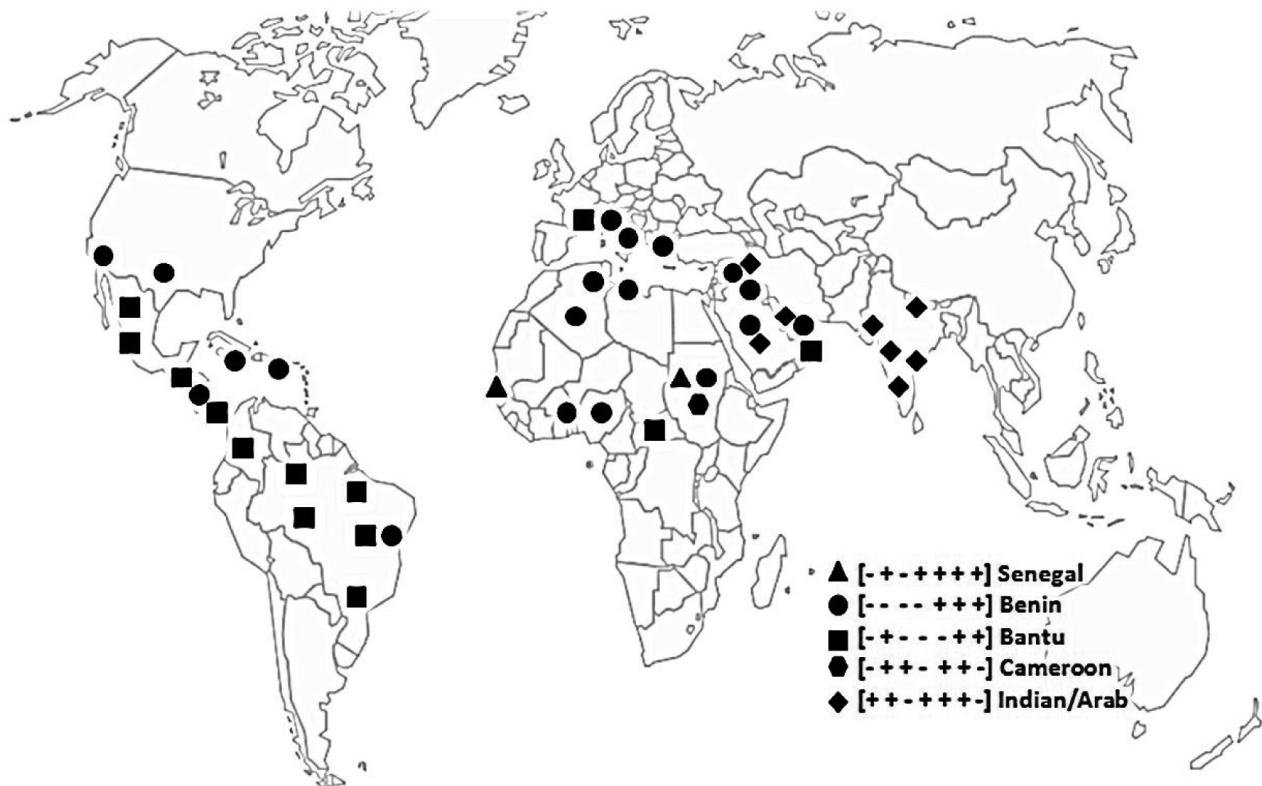
ค

รูปที่ 1 (ก) แสดง DNA polymorphism ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินทั้ง 8 ตำแหน่ง คือ *Hinc* II ในบริเวณ 5' ε - globin gene, *Hind* III ในบริเวณ γ - globin gene, *Hind* III ในบริเวณ δ - globin gene, *Hinc* II ในบริเวณ 3' ψβ - globin gene, *Hinc* II ในบริเวณ 3' ψβ - globin gene, *Ava* II ในบริเวณ β - globin gene, *Hinf* I ในบริเวณ 3' β - globin gene, และ *BamH* I ในบริเวณ 3' β - globin gene และผลการตรวจหาชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I (ข) และ *BamH* I (ค) ในบริเวณ 3' β - globin gene M = λ/*Hind* III, A; -/-, B; +/-, C; +/+ สอดคล้องกันทั้ง *Hinf* I และ *BamH* I polymorphisms

ผลการศึกษา

จากการสืบค้นข้อมูลด้วยคำสำคัญที่กำหนดข้างต้น ตรวจพบเอกสารที่เกี่ยวข้องจำนวนทั้งสิ้น 330 รายการ ประกอบด้วยบทความที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่แล้วจำนวน 327 บทความและวิทยานิพนธ์จำนวน 3 ฉบับ เมื่อคัดเลือกบทความตามเงื่อนไขที่กำหนดในเกณฑ์การคัดเข้าและเกณฑ์การคัดออก คงเหลือบทความที่เกี่ยวข้องโดยตรงจำนวน 33 บทความที่สามารถนำมาศึกษาได้ แบ่งเป็นบทความเกี่ยวกับ Hb S 24 บทความ, Hb E 3 บทความ, Hb C 4 บทความ และ Hb CS 2 บทความ

เมื่อวิเคราะห์รูปแบบแอสโฟลไทป์ที่สัมพันธ์กับ Hb S⁽¹²⁻³³⁾ พบว่ามี แอสโฟลไทป์หลักอยู่ 5 แบบเรียกชื่อตามบริเวณที่พบมาก คือ Senegal [- + - + + +], Benin [- - + + +], Bantu [- + - - - +], Cameroon [- + + - + +] ซึ่งพบในทวีปแอฟริการวมถึงเมดิเตอร์เรเนียน และชนิด Asian/Arab [+ + - + + -] ซึ่งพบมากในตะวันออกกลางและอินเดีย Hb S ที่มีรายงานตรวจพบในคนไทยก็มีแอสโฟลไทป์เป็นชนิด Asian/Arab [+ + - + + -] เช่นกัน⁽³⁴⁾ ข้อมูลทั้งหมดสรุปเป็นภาพได้ดังแสดงใน **รูปที่ 2**



รูปที่ 2 รูปแบบแอสโฟลไทป์ที่สัมพันธ์กับ Hb S ที่มีรายงานตรวจพบทั่วโลก

สำหรับ Hb E ข้อมูลที่ได้ส่วนใหญ่ได้จากการศึกษาในภาคอีสานของไทยซึ่งพบแอสโฟลไทป์หลัก 2 ชนิด คือ [- + - + + -] และ [+ - - - - -] ซึ่งตรงกับ framework 2 มีส่วนน้อยที่พบเป็นชนิด [- + - + - +] ตรงกับ framework 3 ที่เป็นแอสโฟลไทป์หลักของคนกัมพูชา เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล Hb E ที่ตรวจพบในชาวยุโรปจำนวน 2 โครโมโซม ซึ่งมีแอสโฟลไทป์เป็นชนิด [- + + - + -] และ [+ - - - - +]

+] ตรงกับ framework 2 และ 3 แสดงถึงแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน สรุปได้ว่า Hb E ที่ตรวจพบในประชากรโลก มีหลายแหล่งกำเนิดแตกต่างกันระหว่างประชากรที่อาศัยอยู่ในบริเวณตอนเหนือและตอนกลางของกลุ่มแม่น้ำโขง กับบริเวณตอนใต้ของกลุ่มแม่น้ำโขงถึงประเทศกัมพูชา และยุโรป⁽³⁵⁻³⁷⁾ ข้อมูลทั้งหมดไว้ใน ตารางที่ 1 และ รูปที่ 3

ตารางที่ 1 รูปแบบและความถี่ของแฮพโลไทป์ที่สัมพันธ์กับ

Polymorphisms in β -globin gene cluster							Frame work	No of Chromosome		
<i>Hinc</i> II ϵ	<i>Hind</i> III ϵ^{γ}	<i>Hind</i> III ϵ^{α}	<i>Hinc</i> II $\Psi\beta$	<i>Hinc</i> II $\Psi\beta-3'$	<i>Ava</i> II β	<i>Bam</i> HI $\beta-3'$		Southeast Asia ^a	Euro pean ^b	Northeast Thailand ^c
-	+	-	+	+	+	-	2	11	0	262
+	-	-	-	-	+	-	2	6	0	83
-	+	-	+	+	-	+	3	6	0	21
-	+	+	-	+	+	-	2	0	1	0
+	-	-	-	-	+	+	1	0	1	2
-	-	-	-	-	-	+	3	0	0	13
Total								23	2	381

เครื่องหมายบวกและลบแสดงถึงการตรวจพบและไม่พบ polymorphism บริเวณดังกล่าว ข้อมูลจาก ^aAntonarakis et al., 1982, ^bKazazian et al., 1984 และ ^cFucharoen et al., 2002



รูปที่ 3 รูปแบบแฮพโลไทป์ที่สัมพันธ์กับฮีโมโกลบินอีที่ตรวจพบในคนไทยและกัมพูชา

ส่วน Hb C นั้นมีรายงานข้อมูลแอสโฟไทป์ที่ได้จากการศึกษาทั้งในชาวอเมริกันผิวดำ แอฟริกาและซิริเลียน พบว่ามีแอสโฟไทป์คล้ายกันและสามารถจัดเป็นแหล่งกำเนิดเดียวกันคือแบบแอฟริกัน⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ ส่วน Hb C ที่ตรวจพบในคนไทยนั้นพบว่าแอสโฟไทป์แตกต่างจากที่มีรายงานมาก่อน

และถือเป็น non African origin ที่ได้รับการรายงานเป็นครั้งแรกในโลก⁽⁴¹⁾ Hb C จึงมีอย่างน้อย 2 แหล่งกำเนิด ชนิดแรกพบได้ทั่วไปในประชากรที่มีเชื้อสายแอฟริกันและแอฟริกัน-อเมริกัน ส่วนอีกชนิดหนึ่งเป็นชนิดที่พบในคนไทย ข้อมูลทั้งหมดแสดงไว้ใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รูปแบบและความถี่ของแอสโฟไทป์ที่สัมพันธ์กับ Hb C ที่เคยมีรายงานไว้⁽³⁴⁻³⁷⁾

Polymorphisms in β -globin gene cluster							Frame Work	No of Chromosome			
<i>Hinc</i> II ϵ	<i>Hind</i> III $G\gamma$	<i>Hind</i> III $A\gamma$	<i>Hinc</i> II $\Psi\beta$	<i>Hinc</i> II $\Psi\beta$ -3'	<i>Ava</i> II β	<i>Bam</i> -HI β -3'		Ameri-can Black ^a	Ameri-can Black ^b	Sicily ^c	Thai ^d
-	+	-	-	+	+	+	1	22	31	11	0
-	-	-	-	+	+	+	1	2	13	3	0
-	-	-	-	-	+	+	1	1	0	0	0
+	-	-	-	-	-	+	3	0	0	0	15
Total								25	44	14	15

เครื่องหมายบวกและลบแสดงถึงการตรวจพบและไม่พบ polymorphism บริเวณดังกล่าว, ข้อมูลจาก ^a Boehm et al., 1985, ^b Talacki et al., 1990, ^c Travi et al., 1992 และ ^d Sanchaisuriya et al., 2001

ตารางที่ 3 รูปแบบและความถี่ของแอสโฟไทป์ที่สัมพันธ์กับ Hb CS ที่เคยมีรายงานไว้^(42, 43)

Polymorphisms in α -globin gene cluster						Thai ^a	Laos ^a	Cambodian ^a	Chinese ^b	Mediterranean ^b
<i>Xba</i> I	<i>Bgl</i> II	S/M/L	<i>Acc</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>αPst</i> I					
+	-	M	+	+	-	19	6	0	-	-
-	-	M	+	+	-	2	0	0	-	-
+	-	S	+	+	-	94	0	5	-	-
+	-	S	+	-	-	2	0	0	-	-
+	-	M	+	-	-	3	0	0	-	-
+	nd	M	nd	+	nd	-	-	-	1	-
-	nd	L	nd	-	nd	-	-	-	-	4
Total						120	6	5	1	4

เครื่องหมายบวกและลบแสดงถึงการตรวจพบและไม่พบ polymorphism บริเวณดังกล่าว ข้อมูลจาก ^a Singsanan et al., 2007 และ ^b Hartevelde et al., 2001, nd = not done

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลสรุปสำหรับการศึกษา Hb CS ซึ่งมีพบแอฟโพลไทป์ที่คล้ายกันในคนไทย ลาว กัมพูชา และชาวจีน แต่แตกต่างจากที่มีรายงานตรวจพบในชาวเมดิเตอร์เรเนียน ซึ่งแสดงถึงแหล่งกำเนิดอย่างน้อย 2 แหล่ง คือ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงทางตอนใต้ของจีน และ บริเวณในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน^(42,43)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษาโกลบินยีนแอฟโพลไทป์มีประโยชน์ต่อการศึกษาประชากรพันธุศาสตร์ของฮิโมโกลบิน ใช้เป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาการกระจายหรือการเคลื่อนย้ายยีน และใช้บอกถึงต้นกำเนิดของยีนฮิโมโกลบินผิดปกติได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำมาใช้ในศึกษาฮิโมโกลบินผิดปกติที่มีรายงานตรวจพบในประชากรหลายกลุ่มรวมทั้งคนไทย จำนวน 4 ชนิด ที่มีความถี่ของการตรวจพบในคนไทยแตกต่างกัน ได้แก่ Hb S, Hb E, Hb C และ Hb CS

สำหรับ Hb S เป็นฮิโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่โคดอน 6 (GAG → GTG) ของยีนบีตาโกลบิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glutamic acid เป็น valine ในภาวะโฮโมไซโกต ก่อให้เกิดโรค sickle cell anemia มีความชุกสูงในแถบเขตร้อนและกึ่งร้อน ข้อมูลทางระบาดวิทยาแสดงว่า Hb S นี้มีส่วนสำคัญเกี่ยวข้องกับ ความต้านทานในการติดเชื้อมาลาเรีย จากข้อมูลรูปแบบแอฟโพลไทป์ที่สัมพันธ์กับยีน Hb S ในประชากรโลก ดังแสดงใน **รูปที่ 2** แสดงให้เห็นว่า น่าจะมีอย่างน้อย 5 แหล่งกำเนิด⁽¹²⁻³³⁾ โดย 4 ชนิดมีต้นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา ได้แก่รูปแบบ Senegal, Benin, Bantu และ Cameroon อีกรูปแบบหนึ่งพบในเอเชีย คือ รูปแบบ Indian-Arab การมีหลายแหล่งกำเนิดทั้งในแอฟริกาและเอเชีย อาจเป็นสาเหตุให้ตรวจพบ Hb S ได้ในหลายกลุ่มประชากรทั่วโลก ข้อมูลแอฟโพลไทป์ชี้ให้เห็นถึงการกระจายของ Hb S จากทวีปแอฟริกาเข้าไปในทวีปอเมริกา โดยสันนิษฐานว่า Hb S ถูกเคลื่อนย้ายเข้ามาในแถบประเทศลาตินอเมริกีก่อนในยุคสมัยที่มีการค้าทาสจากแอฟริกา โดยพบว่าชาวบราซิลผิวดำที่เป็น sickle cell anemia ส่วนใหญ่มีรูปแบบแอฟโพลไทป์ชนิด Bantu ตามด้วย Benin ชาวอเมริกันผิวดำและจาไมก้าพบว่าชนิด Benin เป็นหลัก ข้อมูลบันทึกทางประวัติศาสตร์แสดงให้เห็นว่า มากกว่าร้อยละ 90 ของการค้าทาสจากแอฟริกาถูกส่งจากประเทศคองโก, แองโกลา และโมซัมบิก ซึ่งพบความชุกของแอฟโพล

ไทป์ชนิด Bantu สูง เข้ามาทางตอนเหนือของประเทศบราซิล โดยมาจากประเทศคองโก, แองโกลา และโมซัมบิก ซึ่งทั้งสามประเทศนี้จะพบความชุกของแอฟโพลไทป์ชนิด Bantu สูง ทำให้พบรูปแบบนี้สูงในประเทศบราซิลและประเทศอื่นในแถบนี้เช่น โคลัมเบีย, เม็กซิโก, เวเนซุเอลา และปานามา ส่วนบริเวณอื่น เช่น จาไมก้า และทางตอนใต้ของรัฐแคลิฟอร์เนียในประเทศสหรัฐอเมริกา นั้นจะพบชนิด Benin เป็นหลัก สำหรับในทวีปเอเชียนั้นพบทั้งรูปแบบที่พบในแอฟริกาและรูปแบบใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานในแอฟริกามาก่อน โดยเชื่อว่ามีต้นกำเนิดจากชาวดิอาระเบียทางตะวันตกและอินเดียจึงเรียกเป็น “Arab-Indian type” ซึ่งพบมากทางตอนใต้ของอินเดีย ส่วนในประเทศชาวดิอาระเบียนั้น ถึงแม้ว่าจะพบรูปแบบที่เป็น “Arab-Indian type” อยู่ทั่วไป แต่ในแถบตะวันตกของประเทศ พบว่ามีรูปแบบแอฟโพลไทป์เป็นชนิด Benin มากกว่า ซึ่งแสดงว่าได้รับมาจากแอฟริกาด้วย จากการศึกษาพบว่ารูปแบบ Arab-Indian type นี้พบได้บ่อยในสหรัฐอเมริกา อเมริกาและทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอิหร่านด้วย

สำหรับ Hb E ซึ่งเป็นฮิโมโกลบินผิดปกติซึ่งพบได้บ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนืออินเดีย เกิดจาก การกลายพันธุ์ของยีนบีตาโกลบินที่ตำแหน่งโคดอน 26 จาก GAG เป็น AAG ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glutamic acid เป็น lysine การกลายพันธุ์นี้ยังกระตุ้น cryptic splice site ทำให้เกิดความผิดปกติของกระบวนการ splicing และทำให้เกิดเป็น β^+ -thalassemia ด้วยจากการวิเคราะห์แอฟโพลไทป์ที่สัมพันธ์กับยีน Hb E ในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังใน **ตารางที่ 1** ตรวจพบรูปแบบของแอฟโพลไทป์ได้ 3 รูปแบบในบริเวณ ไทย ลาว และกัมพูชา คือ (- + - + + -), (+ - - - + -) และ (- + - + - +) โดยสองชนิดแรกพบอยู่บน β -globin gene framework 2 (Ava II +, Bam H I-) ทั้งคู่ จึงอาจพัฒนามาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันแต่แสดงแอฟโพลไทป์ด้าน 5' ต่างกันได้ ด้วยกระบวนการ crossing over ในบริเวณ 5' ของยีน δ -globin ส่วนแอฟโพลไทป์ที่สาม (- + - + - +) จัดเป็น framework 3 (Ava II -, Bam H I+) พบได้บ่อยในชาวกัมพูชาและพบได้บ้างคนไทย แสดงถึงแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน จากการศึกษากระจายของ Hb E และการวิเคราะห์แอฟโพลไทป์ในชนกลุ่มน้อยในภาคอีสานของประเทศไทยซึ่งพบความชุกของ Hb E ที่สูงมากนั้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับแอฟโพลไทป์หลักสองชนิด คือ (- + - + +

+ -) และ (+ - - - + -) ที่พบได้ทั่วไปในคนอิสาน ยกเว้นในกลุ่มส่วยและไทยเขมร ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับแอสโฟไทป์ชนิด (- - - + - +) ที่พบบ่อยในชาวกัมพูชา แสดงถึงความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่างกลุ่มชนดังกล่าว ข้อมูลแสดงให้เห็นว่ารูปแบบแอสโฟไทป์ที่พบบน framework 2 นั้นพบมากในประชากรที่อาศัยอยู่ในบริเวณตอนเหนือและตอนกลางของกลุ่มแม่น้ำโขง ส่วน framework 3 พบบริเวณตอนใต้ของกลุ่มแม่น้ำโขงและชาวกัมพูชาแสดงใน **รูปที่ 2** สำหรับ Hb E ในยุโรปนั้น พบได้ไม่บ่อยและพบอยู่บนโครโมโซมชนิด framework 1 เท่านั้น ซึ่งแสดงถึงต้นกำเนิดที่แตกต่างจากที่รายงานตรวจพบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอินเดีย จึงแสดงว่าต้นกำเนิดของ Hb E ในยุโรปกับเอเชียนั้นแตกต่างกัน และมีข้อสันนิษฐานเช่นเดียวกับ Hb S ว่า Hb E มีความสัมพันธ์และพบมากในบริเวณที่เคยมีการระบาดของเชื้อมาลาเรียมาก่อน

Hb C เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่งของสายบีตาโกลบิน เกิดจากการกลายพันธุ์ที่โคดอน 6 ของยีนบีตาโกลบิน (GAG → AAG) ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก glutamic acid เป็น lysine ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับการกลายพันธุ์ของ Hb S แต่ต่างกันที่ชนิดของการกลายพันธุ์ Hb C พบมากในคนเชื้อสายแอฟริกา และพบได้บ้างในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่นเดียวกับ Hb S และ Hb E เชื่อว่า Hb C มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรีย ในอดีตเชื่อว่าพบได้เฉพาะกลุ่มคนเชื้อสายแอฟริกาและแอฟริกันอเมริกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์แอสโฟไทป์ในชาวอเมริกันเชื้อสายแอฟริกาและชาวซิชิลเลียน พบว่าสัมพันธ์กับแอสโฟไทป์ (- - - + - +) และจัดเป็น African origin ที่มีต้นกำเนิดเดียวกัน แต่จากการตรวจพบ Hb C ในคนไทยและรายงานแอสโฟไทป์ที่สัมพันธ์กับ Hb C ในคนไทย พบว่ามีรูปแบบแอสโฟไทป์ที่แตกต่างจาก African origin โดยสิ้นเชิง โดยในคนไทยพบรูปแบบแอสโฟไทป์ (+ - - - - +) ซึ่งแสดงถึงต้นกำเนิดที่แตกต่างกันและถือเป็นการรายงาน non-African origin ของ Hb C เป็นครั้งแรกของโลก ดังแสดงใน **ตารางที่ 2** ⁽⁴⁰⁻⁴³⁾

Hb CS เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่โคดอนยูติ (TAA → CAA) ของยีนอัลฟาโกลบิน ทำให้สามารถแปลรหัสไปเป็นกรดอะมิโนชนิด glutamine และสามารถแปลรหัสต่อไปได้อีกเกิดเป็น elongated chain ทำให้ Hb CS มีขนาดใหญ่กว่าปกติและไม่เสถียรและมักพบได้ในปริมาณต่ำในเลือดจึงอาจวินิจฉัยผิดพลาดได้ง่ายในงาน

ประจำวัน Hb CS เป็นสาเหตุหลักของอัลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่มีการขาดหายของยีน (non-deletion type) ในคนไทยและกลุ่มคนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงตอนใต้ของจีน จากการวิเคราะห์ลักษณะแอสโฟไทป์ของ Hb CS ที่เคยมีรายงานเบื้องต้นไว้ในชาวจีนและชาวเมดิเตอร์เรเนียนพบว่า มีรูปแบบที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าทั้งในยุโรปและเอเชียนั้นมีต้นกำเนิดของ Hb CS ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาใน Hb CS ในคนไทย ลาว เขมร ในจำนวนที่มากขึ้น พบว่ามีรูปแบบของแอสโฟไทป์คล้ายกับที่รายงานตรวจพบในคนจีนแต่ต่างจากเมดิเตอร์เรเนียน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าต้นกำเนิดของ Hb CS มีมากกว่าหนึ่งแหล่งกำเนิด ดังแสดงใน **ตารางที่ 3** และน่าจะเป็นสาเหตุให้มีการตรวจพบ Hb CS มากในพื้นที่แถบนี้ ^(42, 43)

ตัวอย่างข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์แอสโฟไทป์ที่สัมพันธ์กับฮีโมโกลบินผิดปกติที่ตรวจพบในประชากรสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาถึงภูมิหลังทางพันธุศาสตร์ประชากรได้เป็นอย่างดี ข้อมูลแอสโฟไทป์ที่สัมพันธ์กับ Hb S, Hb E, Hb C และ Hb CS ที่ศึกษาแสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้ค่อนข้างบ่อยเหล่านี้ ล้วนมีหลายต้นกำเนิดทั่วโลก ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษเกี่ยวกับประชากรพันธุศาสตร์ของฮีโมโกลบินได้ โดยอาจจำเป็นต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์อย่างอื่นช่วยวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นายวิทยา จอมอูย เป็นนักศึกษาปริญญาเอกที่ได้รับทุนจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย รุ่นที่ 13 สัญญาทุนเลขที่ PHD/0210/2553 รหัสนักศึกษา 5. L. KK / 53 / D. 1

เอกสารอ้างอิง

1. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nat Genet 1999; 22: 231-8.
2. Fukumaki Y, Fucharoen S. Generation and

- spread of globin gene mutation in populations : β -thalassemia in asian countries. In Kimara M, Takahara N (eds): New Aspects of the Genetics of Molecular Evolution. Berlin. Springer 1991; 153-76.
3. Higgs DR, Wainscoat JS, Flint J, Hill AV, Thein SL, Nicholls RD, et al. Analysis of the human alpha-globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 5165-9.
 4. Tsintsof AS, Hertzberg MS, Prior JF, Mickleson KN, Trent RJ. Alpha-globin gene markers identify genetic differences between Australian aborigines and Melanesians. Am J Hum Genet 1990; 46: 138-43.
 5. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. Cold Spring Harbor Perspect Med 2013; 3.
 6. สุพรรณ ฟุเจอร์ญ, กุลนภา ฟุเจอร์ญ. ฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในคนไทยและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2553; 22: 103-7.
 7. สุพรรณ ฟุเจอร์ญ. ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทย: แนวทางการตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุล. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2554; 23: 1-6.
 8. กานดา ศรกายสิทธิ์, กุลนภา ฟุเจอร์ญ, สุพรรณ ฟุเจอร์ญ, อรุณ ไขบุญเรือง, มัทนี ชิวเสถียรชัย, พัทธกรณ ฝานิช และคณะ. อุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงและฮีโมโกลบินปากเซที่จังหวัดขอนแก่น: ดำรงด้วยวิธี capillary electrophoresis และการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2555; 24: 291-8.
 9. สิทธิชัย ปัญญาใส, สุริยา ไชยนาคร, สุพรรณ กำลังมาก, จุฬพร อาษาศึก, ปิยชาติ ชัยบังคม, สุพรรณ ฟุเจอร์ญ. ความถี่ของฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงและฮีโมโกลบินปากเซในจังหวัดพะเยา. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2557; 26: 40-7.
 10. Semenza GL, Dowling CE, Kazazain HH. *Hinf* I polymorphism 3' to the human β -globin gene detected by the polymerase chain reaction (PCR). Nucleic Acids Research 1989; 17: 2376.
 11. Fukumaki Y, Fucharoen S. Generation and Spread of globin gene mutation in populations: b-thalassemia in Asian countries. In Kimara M, Takahara N (eds): New Aspects of the Genetics of Molecular Evolution. Berlin, Springer 1991, pp 153-76.
 12. Abbes S, Fattoum S, Vidaud M, Goossens M, Rosa J. Sick cell anemia in the Tunisian population: haplotyping and Hb F expression. Hemoglobin 1991; 15: 1-9.
 13. Al-Allawi NA, Jalal SD, Nerwey FF, Al-Sayan GO, Al-Zebari SS, Alshingaly AA, et al. Sick cell disease in the Kurdish population of northern Iraq. Hemoglobin 2012; 36: 333-42.
 14. Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Theisen CE, Dover GJ. Origin of the beta S-globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 853-6.
 15. Boussiou M, Loukopoulos D, Christakis J, Fessas P. The origin of the sickle mutation in Greece; evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. Hemoglobin 1991; 15: 459-67.
 16. Cuellar-Ambrosi F, Mondragon MC, Figueroa M, Prehu C, Galacteros F, Ruiz-Linares A. Sick cell anemia and beta-globin gene cluster haplotypes in Colombia. Hemoglobin 2000; 24: 221-5.
 17. Daar S, Hussain HM, Gravell D, Nagel RL, Krishnamoorthy R. Genetic epidemiology of Hb S in Oman: multicentric origin for the betaS gene. Am J Hematol 2000; 64: 39-46.
 18. De Mello Auricchio MT, Vicente JP, Meyer D, Mingroni-Netto RC. Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations. Hum Biol 2007; 79: 667-77.

19. Elderderly AY, Mills J, Mohamed BA, Cooper AJ, Mohammed AO, Eltieb N, et al. Molecular analysis of the beta-globin gene cluster haplotypes in a Sudanese population with sickle cell anaemia. *Int J Lab Hematol* 2012; 34: 262-6.
20. Guzman LF, Perea FJ, Magana MT, Morales-Gonzalez KR, Chavez-Velazco ML, Ibarra B. Hb S [beta6(A3)Glu-->Val, GAG>GTG] in Mexican Mestizos: frequency and analysis of the 5' beta-globin haplotype. *Hemoglobin* 2010; 34: 509-15.
21. Imen M, Ikbel BM, Leila C, Fethi M, Amine Z, Mohamed B, et al. Restriction mapping of betaS locus among Tunisian sickle-cell patients. *Am J Hum Biol* 2011; 23: 815-9.
22. Keclard L, Ollendorf V, Berchel C, Loret H, Merault G. Beta S haplotypes, alpha-globin gene status, and hematological data of sickle cell disease patients in Guadeloupe (F.W.I.). *Hemoglobin* 1996; 20: 63-74.
23. Kulozik AE, Wainscoat JS, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJ, et al. Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* 1986; 39: 239-44.
24. Labie D, Srinivas R, Dunda O, Dode C, Lapoumeroulie C, Devi V, et al. Haplotypes in tribal Indians bearing the sickle gene: evidence for the unicentric origin of the beta S mutation and the unicentric origin of the tribal populations of India. *Hum Biol* 1989; 61: 479-91.
25. Lemos Cardoso G, Farias Guerreiro J. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. *Am J Hum Biol* 2006; 18: 93-8.
26. Magana MT, Ongay Z, Tagle J, Bentura G, Cobian JG, Perea FJ, et al. Analysis of beta S and beta A genes in a Mexican population with African roots. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 28: 121-6.
27. Mukherjee MB, Surve RR, Gangakhedkar RR, Ghosh K, Colah RB, Mohanty D. Beta-globin gene cluster haplotypes linked to the betaS gene in western India. *Hemoglobin* 2004; 28: 157-61.
28. Niranjan Y, Chandak GR, Veeraj P, Singh L. Some atypical and rare sickle cell gene haplotypes in populations of Andhra Pradesh, India. *Hum Biol* 1999; 71: 333-40.
29. Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1771-3.
30. Rusanova I, Cossio G, Moreno B, Javier Perea F, De Borace RG, Perea M, et al. beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. *Am J Hum Biol* 2011; 23: 377-80.
31. Samarah F, Ayesh S, Athanasiou M, Christakis J, Vavatsi N. Beta(S)-globin gene cluster haplotypes in the West Bank of Palestine. *Hemoglobin* 2009; 33: 143-9.
32. Schroeder WA, Powars DR, Kay LM, Chan LS, Huynh V, Shelton JB, et al. Beta-cluster haplotypes, alpha-gene status, and hematological data from SS, SC, and S-beta-thalassemia patients in southern California. *Hemoglobin* 1989; 13: 325-53.
33. Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu beta s cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol* 1992; 88: 295-8.
34. ยศสมบัติ จังตระกุล, วิษย์ศักดิ์ สุขสะอาด, กุลนภา พุเจริญ, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, สุพรรณ พุเจริญ. การตรวจพบฮีโมโกลบินเอสในคนไทย. *สงขลานครินทร์เวชสาร* 2545; 20: 201-9.
35. Antonarakis SE, Orkin SH, Kazazian HHJr, Goff SC, Boehm CD, Waber PG, et al. Evidence for multiple origins of the beta E-globin gene in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 6608-11.

36. Fucharoen G, Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Sae-Ung N, Suyasanond U, Sriwilai P, et al. Frequency distribution and haplotypic heterogeneity of beta(E)-globin gene among eight minority groups of northeast Thailand. *Hum Hered* 2002; 53: 18-22.
37. Kazazian HH Jr, Waber PG, Boehm CD, Lee JI, Antonarakis SE, Fairbanks VF. Hemoglobin E in Europeans: further evidence for multiple origins of the beta E-globin gene. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 212-7.
38. Boehm CD, Dowling CE, Antonarakis SE, Honig GR, Kazazian HH Jr. Evidence supporting a single origin of the beta(C)-globin gene in blacks. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 771-7.
39. Talacki CA, Rappaport E, Schwartz E, Surrey S, Ballas SK. Beta-globin gene cluster haplotypes in Hb C heterozygotes. *Hemoglobin* 1990; 14: 229-40.
40. Travi M, Cremonesi L, Primignani P, Di Benedetto S, Testa R, Schiliro G, et al. Molecular characterization of hemoglobin C in Sicily. *Am J Hematol* 1992; 39: 5-8.
41. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Siriratanawong N, Surapot S, Fucharoen S. Molecular characterization of hemoglobin C in Thailand. *Am J Hematol* 2001; 67: 189-93.
42. Harteveld CL, Traeger-Synodinos J, Ragusa A, Fichera M, Kanavakis E, Kattamis C, et al. Different geographic origins of Hb Constant Spring (a2 codon 142 TAA-->CAA). *Haematologica* 2001; 86: 36-8.
43. Singsanan S, Fucharoen G, Savongsy O, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Molecular characterization and origins of Hb Constant Spring and Hb Paksé in Southeast Asian populations. *Ann Hematol* 2007; 86: 665-9.