วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ Vol. 1 No. 3
Bulletin of Chiang Mai Medical Technology September 1968

HEMOGLOBIN ELECTROPHORESIS ON CELLULOSE ACETATE IN CHIANG MAI MEDICAL STUDENTS AND PATIENTS *

จำรัสศรี เกษมสวัสดิ์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) **

Consultant: พูนศรี ธรรมาสถิตย์ พ.บ., M.Sc. Med. (Pen). ***

Eelectrophoresis เป็นที่รู้จักกันมานานราว 150 ปีแล้ว ในปี ค.ศ. 1807 Alexander Reuss นักฟิสิคส์ชาวรัสเซีย ได้พบว่าถ้าผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปในหลอดแก้วที่มีดินเหนียวละลายอยู่ในน้ำ พวก colloidal clay จะเดินไปหาขั้วบวก ซึ่งปรากฏการณ์อันนี้ Faraday ชาวอังกฤษ และ E.H. Dubois Reymond แห่งเยอรมันนี ก็ได้ค้นพบว่าเป็นความจริง นอกจากนี้ยังได้พบอีกว่า Negative charged particles ใน solution หรือ suspension จะเดินไปสู่ขั้วบวก ส่วน Positive charged particles จะเดินไปสู่ขั้วลบ Particles เหล่านี้จะเดินไปได้เร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับ Excess charge ที่มีอยู่ หากยิ่งมี charge มาก จะ migrate ได้เร็วขึ้น หลักอันนี้ได้นำมาใช้แยก Particles หลายชนิดออกจาก mixture โดยใช้ Electical properties ของมันเป็นหลักในการทำ Electrophoresis.

สิ่งจำเป็นในการแยกโดย Electrophoresis คือ

1. ต้องมี electrically active particle คือหมายความว่าต้องมี positive charge มากกว่า negative charge บน surface ของ particle นั้น ๆ, หรือตรงกันข้าม, หรือจะเรียกว่ามี ionized particle ก็ได้ แต่สารบางอย่าง เช่น polysaccharides ไม่มี excess charge, particle ก็แยกไม่ได้ เพราะสารพวกนี้จะไม่ migrate ไปทางไหนเลย แต่พวก Protien ทุกชนิดมี excess charge อยู่เสมอ เพราะฉะนั้นก็เหมาะสำหรับใช้แยก

---

* The Term Paper for the Degree of B.S. (M.T.)

** โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

*** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โดย electrophoresis

2. Solution ที่จะเป็นสื่อกระแสไฟฟ้า เช่นน้ำเป็นสื่อที่เลว ฉะนั้น จึง จำเป็น ต้อง เติมกรด หรือด่าง หรือเกลือ บางชนิด สุด แต่ กรณี เพื่อให้เป็นสื่อที่ดีขึ้น

ทั้งสองอย่างนี้ จำ เป็น สำหรับ electrophoresis แต่ยังมีส่วนประกอบอีกดังจะได้อธิบายเป็นตอนๆ ไป

Electrophoresis มี 3 วิธีด้วยกัน.–

1. Microscopic electrophoresis
2. Moving boundary electrophoresis
3. Zone electrophoresis

ทั้งสามชนิดใช้หลักอันเดียวกัน แต่วิธีและเครื่องมือผิดกันเท่านั้น

Microscopic Electrophoresis

โดยสังเกตและวัด migration ของ particle ใน solution หรือ suspension ที่อยู่ใน หลอดแก้ววางตามยาวบน stage ของกล้องจุลทัศน์ ในวิธีนี้ particle ใหญ่ ๆ เท่านั้น จึงเห็นได้ชัด เช่น colloid particle, bacteria etc. ในวิธีนี้ใช้กับ molecule ไม่ได้ เพราะเล็กเกินไปที่จะเห็นได้ด้วยกล้องจุลทัศน์ ก็ได้มีวิธีดัดแปลงคือใส่ quartz sphere เข้าไปใน solution, molecule จะติดอยู่บน quartz shere นั้นหนาประมาณ 1 molecule, เพราะฉะนั้น sphere ที่ถูกเคลือบด้วย protein ก็จะแสดงกริยาต่อกระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับ molecule ของ protein เหมือนกัน

วิธีนี้ใช้ศึกษา immune bodies ใน liquids แต่ขณะนี้ไม่ได้ใช้กันแพร่หลายเสียแล้ว เพราะมีวิธีใหม่ที่แยก particle เล็ก ๆ ดีกว่า และแยกของจำนวนมากๆ ได้ และไม่จำเป็นจะต้องเป็น particle ที่ขนาดพอเห็นได้ด้วยวิธีนี้คือ Moving Boundory Electrophroesis.

Moving Boundory Electrophoresis

ในวิธีนี้แทนที่จะสังเกตและวัด porticle ใด particle หนึ่ง วิธีนี้วัด movement ของ boundary ของกลุ่มของ particle โดยใส่สิ่งที่ต้องการศึกษาในก้นของ U–tube และค่อยๆใส่ electrolyte หรือ buffer ลงข้างบนทั้งสองข้าง

การใส่ buffer ต้องใส่อย่างระมัดระวัง เพื่อให้แยกกันเป็น boundary ชัดเจน แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าลงไปโดยใส่ electrode ข้างบน buffer ทั้งสองข้าง จุดประสงค์ก็คือดูว่า boundary จะ move ไปช้าหรือเร็ว หรือไปทางใด

ถ้าเป็น protein, ซึ่งมี excess positive charges อยู่บน molecular surface, boundary จะ move ไปทางขั้วลบ ประจุอันหนึ่ง ๆ จะลาก molecule อันใหญ่ของ protien ไปตามทางที่ประจุบวกเดินไป ยิ่งมีประจุมากก็ยิ่งเคลื่อนไปเร็วขึ้น

ถ้าเปลี่ยน pH เช่นทำให้ pH สูงขึ้นเรื่อย boundary จะเคลื่อนช้าลงทุกที จนกระทั่งไม่เคลื่อนเลย แต่ถ้า pH เป็นในด้าน ที่เป็น ด่าง, negative charge ของ protoin จะแสดงออกมาโดยดึง melecule ไปในด้านตรงกันข้าม boundary จะเคลื่อนไปในด้านขั้วบวก

เพราะฉนั้นใน electrophoresis, electrolyte solution เป็นของสำคัญที่สุด และ pH จะต้องจัดให้แน่นอนที่สุด จึงได้แก้ไขโดยใช้ buffer solution แทน (pH ของ buffer ที่ Substance มี electrical equilibrium คือไม่เคลื่อนไปในทิศ ทาง ใดเป็น isoelectric point ของ substance นั้นๆ)

สารทุกอย่างมี isoelectric point เป็น characteristic ของตนเอง เพราะการใช้ moving boundary method นี้ก็ใช้หา isoelectric point ของสารแต่ละชนิดได้ วิธีที่ใช้แพร่หลายทุกวันนี้คือวิธีของ Tiselius

Moving Boundary Method ค้นพบโดย Arne Wilhelm Kaurin Tiselius เพราะฉนั้นโดยมากเครื่อง electrophoresis นี้มักจะได้ชื่อว่า Tiselius apparatus, Tiselius ศึกษาภายใต้ Syedcerg ซึ่งขณะนั้น กำลัง ทำ ultracentrifuge อยู่และได้แนะนำ ลูก ศิษย์ของเขาถึง electrophoresis ว่าอาจจะใช้ประโยชน์ได้ Tiselius ได้เริ่มทดลองและในปี 1930 ได้เสนอวิทยานิพนธ์ เพื่อดุษฎีบัณฑิต ว่าด้วย electrophoresis

ในปี 1937, Tiselius ได้ตีพิมพ์ใน Transaction ของ Faraday society of London ถึงเครื่องมือใหม่ใน electrophoresis และ Tiselius ได้แสดงให้เห็นว่า Blood fraction globulin นั้น ที่แท้จริงมีถึง 3 อย่างไม่ใช่อย่างเดียว และให้ชื่อว่า alpha, beta, และ gamma globulin

ตั้งแต่ Tiselius ได้แสดงให้เห็นถึงคุณค่าของเครื่องมือของเขาแล้ว ทุกคนก็อยากได้ไว้ทดลองบ้าง ในอเมริกา Longsworth และ Mac Innes ได้สร้าง ขึ้น ตาม แบบ Tiselius และได้ผลดีมาก จึงเป็นเครื่องกระตุ้นทำให้การค้นคว้าทางชีวเคมีเจริญไปอย่างรวดเร็วทั่วในอเมริกาและยุโรป

ก่อนหน้าที่ Tiselius จะตีพิมพ์งานของ

เขาให้โลกรู้ก็ปรากฏว่า boundary layer ที่ได้ไม่ชัดเจน และทุกๆ คนก็รู้แล้วว่าถ้าผ่าน current ลงไปใน solution ย่อมเกิดความร้อน ทำให้ resolving power เสียไป Tiselius แก้ปัญหานี้ตกโดยใช้หลอดแก้วเป็นเหลี่ยมแทนที่จะกลมๆ และแช่หลอดแก้วในน้ำที่มีอุณหภูมิ 38° F

น้ำเย็นทำให้ resolving power ดีขึ้น Tiselius ใช้ Schlieven Method เพื่อทำให้เห็น Boundary layer

Schlieren Method นี้ ชาวฝรั่งเศส J.B. L. Eoucault ทำไว้เมื่อ 100 ปีก่อนแล้ว นอกจากนี้ Tiseliua ยังดัดแปลง U-tube ให้เป็นส่วนๆ แต่ละส่วน เคลื่อน ออก จาก กัน ได้ เพราะฉนั้นก็ทำให้แยกส่วนใด ส่วน หนึ่งของ Protcin ที่กำลังศึกษาออกได้

ในปี 1939 Harry Svensson แห่ง Uppsala, ได้ใช้ cylindrical lens แทน Schlieren systen ทำให้เห็นเป็น curve แทนที่จะเห็นเป็น peak and valley สดำอย่างใน Schlieren Method

Peak แรกที่สุดคือเงาของ Albumin boundary ส่วน peak ที่ตามมาคือพวก globulins เรียงตามลำดับความเร็วที่มันเคลื่อนที่ไป คือ alpha, beta, และ gamma

Longsworth ได้ ทดลองใช้ buffer barbiturate (vetonal buffer) ก็พบว่ามี peak อีก peak หนึ่งระหว่าง albumin และ alpha globulin แต่คุณสมบัติเมื่อเอาไปทดลองแล้วเป็น globulin จึงเรียกเสียใหม่ว่าเป็น alpha-I globulin ส่วน alpha globulin เดิมก็เรียกว่า alpha-2 globuiin

Zone Electrophoresis

ภายใน 10 กว่าปีที่แล้วมานี้ ก็ได้มีการค้นพบการทำ Electrophoresis วิธีที่สามในสองวิธีที่แล้วมานั้น particle จะเคลื่อนที่ใน fluid medium แต่วิธีใหม่นี้ particle จะผ่าน solid medium, particle จะเข้ามารวมกันอยู่เป็น Zone ใน solid medium แทนที่จะเป็น boundary อย่างสองวิธีแรก

Tiselius, Svensson และ Ingra Brattsten แห่ง Uppsala, Sweden, ในเยอรมันนี Theodore Wieland และ Fritz Turba, ในอเมริกาก็มี Emmett L. Durrum, ทั้งสามฝ่ายต่างค้นพบได้ในเวลาไล่เรี่ยกัน

solid medium ที่ใช้มากที่สุดในขณะนั้นก็ได้แก่กระดาษกรอง บางทีจึงเรียก Zone electrophoresis ว่า paper electrophoresis โดยใช้กระดาษกรองสี่เหลี่ยมวาง ตาม แนวนอน และ ปลาย จุ่ม ลง ไป ใน ภาชนะ 2 ข้าง

ภาชนะน้ำใส่ buffer solution และมีขั้วไฟฟ้าทั้งสองข้าง แล้วหยดสิ่งที่ต้องการศึกษาลงบนกระดาษกรองก็จะเป็นจุดซึมอยู่ในกระดาษกรองนั้น เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้า, Components ต่างๆ ของ mixture นั้นจะเคลื่อนไปเห็นระยะต่างๆ กัน สุดแต่ chatges ที่อยู่บน surface ของมัน สุดท้ายก็จะกลายเป็นจุดหลายจุดหรือโซนหลายโซน ซึ่งแต่ละอันก็เป็น fraction ของ mixture นั้นๆ ความเข้มทึบและความกว้างของจุดหนึ่งๆ ก็แสดงถึงจำนวนของมัน ส่วนระยะที่เคลื่อนไปจากจุดต่างกันก็เป็น mobility ของสิ่งนั้นในบางกรณี เราก็ไม่อาจเห็นจุดหรือโซนเหล่านี้ได้ ก็จำเป็นต้องย้อมสีเพื่อให้เห็น หลักอันนี้ก็คล้ายคลึงกับ paper chromatography เว้นแต่ใช้ไฟฟ้าเป็นเครื่องแยกแทนที่ใช้ solubility

มีผู้เปลี่ยน Solid medium ไปต่างๆกัน เช่น asbestos (Butler,1947), Glass wool (Coolidge 1939), Silica Gel (Consden, Gordon และ Martin 1946) Agar (Gordon, Kiel, Sebasta, Knessel และ Sorm ในปี1950)

วิธี paper electrophoresis นิยมใช้กันมากเหมือนกันเพราะ

1. เครื่องมือง่ายและ ทน ทาน ไม่แพง อย่าง Tiselius apqaratus และกินเนื้อที่น้อย

2; ใช้จำนวนของสิ่งที่ต้องการศึกษาน้อยเช่น serum ใช้ประมาณ 0.015-0.16 c.c. ก็พอ

3. สามารถทำได้ทีหลายๆ ตัวอย่าง (Sample)

4. สามารถทำได้ในอุณหภูมิปกติ

ข้อเสียของ paper electrophoresis

1. ใช้เวลานานประมาณ 18-20 ซ.ม.

2. Fraction ที่ได้ไม่ชัด

3. มักมี Tailing ออกมาให้เห็น เวลาอ่านผลดูลำบาก

ในปี 1957 Owen และ Got ได้ใช้ Starch gel. แยก Foetal hemoglobin และ Adult hemoglobin แต่มี hemoglobin บางชนิดเช่น Lepore ไม่สามารถจะแยกจาก A และ A_2 ได้ ต้องใช้ Buffer ซึ่งต้องใช้ Borate มีความเข้มข้นมากๆ ในปี 1959 Cradock Watson, Fenton และ Lechmann ได้ใช้ Tris-E.D.T.A. buffer เวลาใช้ก็ dilute 1 ใน 3

ปี 1961 Lechmann และ Sharih ได้แยก Lepore hemoglobin ออกมาได้โดยใช้ Tris- E.D.T.A buffer บน paper Electrophoresis

Kunkel และ Wrllenius ได้ใช้ Starch

block electrophoresis และสามารถแยก A_2 ออกมาได้ และพบค่า mean จากคน normal ได้ประมาณ 2.5% และสามารถแยก Normal group และ Abnormal group ได้ และพบว่า A_2 จะสูงขึ้นใน Thalassemia minor ซึ่งมี Microcytosis ร่วมด้วย

ในระหว่างปี 1958-1960 J-kohn ได้ลองใช้และแนะนำให้ใช้ Cellulose acetate membrane เป็น supporting medium เพราะทำง่าย และใช้เวลาสั้นกว่าวิธี Filter paper และ Starch block method ซึ่งต้องใช้เวลานาน

ต่อมาปี 1962 petrakis, Doherty, Grunbaum และ Atchley ก็ได้ทดลองใช้และได้ผลดี ในปีเดียวกันนี้ Friedman, Afonso ก็ได้ทดลองใช้บ้าง

ในปี 1963 Graham และ Grunbaum ก็ได้แก้ไขอีกครั้งหนึ่งและได้ดัดแปลงเครื่องมือและวิธีการย้อมสี เพื่อดู fraction ของ A_2 ได้ดีและชัดขึ้น

ในปี 1963 นั้นเอง Bartlett ได้หาค่าของ Hemoglobin A_2 ในคนปกติ โดยใช้ elute fraction ซึ่งไม่ต้องย้อมสีก็เห็น และทราบผลภายใน 90 นาที หลังจากที่ได้รับ specimen มา โดยใช้หาแบบ Electrophoresis โดยใช้ cellulose acetate membrane เป็น supporting medium และใช้ Tris buffer ซึ่งมี pH 8.9, power supply ใช้กระแสไฟ 10 mA ที่ 200 Volts ใน Horizontal plane และใช้ Spectrophotometer wavelength 413 m และแยกได้ดีที่สุดในเวลา 45 นาที ที่ 20-25 Volt/cm. กระแสไฟ 0.3-0.5 mA/cm.

Method of electrophoresis

1. Horizontal Method. คือ cellulose membrane วางตามแนวนอน

2. Vertical Method. คือ cellulose membrane ห้อยลงมาจากข้างบน ประกอบด้วย

1. Chamber หรือ Electrophoresis cell
2. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า(Power Supply)
3. Buffer เป็นตัวทำให้ชื้น และทำให้ pH เหมาะแก่การ ที่จะ แยก ตัวของ สาร และเป็นตัวที่จะละลายสารที่จะแยกได้
4. Wick มีหน้าที่ดูดความชื้นออกจาก Buffer
5. Bridge สำหรับเป็นตัว นำ ไฟฟ้า และไม่ให้ pH เปลี่ยนไป
6. Electrode คือ platinum wire
7. Supporting medium คือวัตถุที่ทำให้กระแสไฟฟ้า หรือสารที่จะแยกวิ่งผ่านได้เช่น

1. Filter paper No. 1,3 mm. ซึ่งค่อนข้างจะหนามากจะให้น้ำเกาะดีกว่า No.1 วิธีนี้จะทำได้ง่าย แต่จะมี Tailing เกิดขึ้นดูลำบาก

2. Agar gel โดยเอา Agar ทำให้เป็นวุ้นแล้วราดลงบน Slide แล้วเอาสิ่งที่ต้องการจะแยก หยดลงแล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าก็จะ move ได้

3. Starch gel. จะแยกได้ดีแต่ราคาแพง

4. Starch Block ทำยากต้องใช้เวลานาน

5. Membrane or Cellulose acetate เนื้อละเอียดและไม่มี tailing เกิดขึ้น seperation ดี แต่ราคาแพงมาก และใช้เวลาเพียง 45 นาที ก็อ่านผลได้ ซึ่งขณะนี้กำลังนิยมใช้กัน

Hemoglobin Electorphoresis on cellulose acetate

Principle of Electrophoresis.

สารที่เอามาแยก เรียกว่ามี electrical charge เช่น protein จะมี Amino acid หลายตัวต่อกันเป็น chain ยาว Amino acid แต่ละตัวจะมี electrical charge ที่ pH หนึ่ง Total protein จะมี electrical charge เป็น + หรือ − Iso-electric point อยู่ที่ pH 6 หมายถึง Electrical charge=0 เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปสารนี้โดยมี Buffer หนึ่ง ที่มี pH 6 ถ้าเปลี่ยน pH สารนี้ก็จะมีการ move ได้ อาจจะ move ไปทางขั้ว + หรือขั้ว − จากจุดที่ตั้งต้นของมัน ถ้าสารใดมี electrical charge 2^+ จะ move ออกมาได้เป็น 2 เท่า ซึ่งขึ้นอยู่กับ

1. Electrical charge ของสารแต่ละชนิด

2. ขึ้นอยู่กับกระแสไฟที่ผ่านสารนั้น

Hemoglobin electrophoresis

Hemoglobin ประกอบด้วย Heme+ globin, เป็น protein molecule ซึ่งประกอบด้วย Amino acid ต่อกันเป็น chain ยาว 4 chains แต่ละตัวจะมี electrical charge แต่มีบาง chain จะมี Electrical charge ไม่เหมือนกัน เราเรียกว่ามี Abnormal hemoglobin เกิดขึ้น

ในคนปกติ (Normal) ผู้ใหญ่จะมี Hemoglobin ส่วนใหญ่เป็น Hb.A และมี Hb. A_2 อยู่ประมาณ 3–3.5% และมี Hb. F ไม่เกิน 2% ฉนั้นมี Hb. A ประมาณ 95%

Hb. F กับ Hb. A จะแยกกันไม่ออก เราจึงแยกโดยวิธี Alkaline resistance Hb.F จะมีคุณสมบัติไม่ละลายในด่าง

ส่วน Hb. A_2 จะเห็นเป็นเงานิดหน่อย

Individual hemoglobin

Henoglobin A ปกติใน Adult จะมี Hb.A เป็นส่วนใหญ่ และมี Hb. A_2 เป็นส่วนน้อย Kunkel ได้ใช้วิธี starch block electrophoresis และพบว่าในคนปกติ Adult จะมี A_2 ไม่เกิน 3% ของ Hemoglobin ทั้งหมดใน Thalassemia พบว่ามี A_2 มาก บางทีอาจจะมากกว่า 27%

Henoglobin F ปี 1866 Korber ได้พบ Hb.F I929 Hauorwitz ได้ศึกษาเกี่ยวกับ denaturation reaction ซึ่งจะแยก Hb.F ออกจาก Hb.A โดยที่ Hb.A ละลายใน Aikaline solution ส่วน Hb.F ไม่ละลายใน Alkaline solution ปกติใน Adult จะพบ Hb.F ประมาณ 2% หรือต่ำกว่านั้น ปกติ Hb.F นี้จะพบในเด็กเกิดใหม่ ประมาณ 50-70% หลังคลอดออกมาแล้ว Hb.F จะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งอายุ 1-2 ปี จะมี Hb.F ปกติ คือ ไม่เกิน 2% ถ้าพบ Hb.F สูงในเด็กหรือในผู้ใหญ่ถึง 20% ก็เป็น Homozygous Thalassemia ถ้าสูงกว่า 20% ขึ้นไปก็เป็น Heterozygous Thalassemia และ Hp.F จะสูงใน Sickle cell anemia.

Hemoglobin S จะพบใน Sickle cell anemia ซึ่งจะพบมากที่สุดใน Negroes แถวทะเลเมดิเตอร์เรเนียน จะพบว่ามี Hb.S มากกว่า 45% ส่วน American Negro จะพบประมาณ 9%

Hemoglobin C พบในปี 1950 โดยวิธี paper electrophoresis ที่ pH 8.6 และพบบ่อยๆ ในพวก Negroes Hb.C คล้าย Hb.S ซึ่งจะรวมกันไปใน Thalassemia

Hemoglobin D พบในปี 1951 ในหลายประเทศ เช่นในพวก American Negro พบ 0.4% ในอินเดียประมาณ 2% ในการทำ electrophoresis motility ของ Hb.D จะเหมือนกับ Hb.S ที่ pH 8.6

Hemgolobin E จะพบในแถบอาเซียตะวันออกเฉียงใต้ เช่นพม่า, ซีลอน, ประเทศไทย ในไทยจะพบว่ามี Hb.E ประมาณ 12% ลักษณะของเม็ดเลือดแดงมี Target cell เรียกว่า Hb.E Thalassemia, Hb.E move เหมือนกับ Hb. A_2

Hemoglobin G จะรวมไปกับ Hb.S, S-C และ S-D ซึ่งพบใน Severe anemia

Hemoglobin H เป็น Fast hemoglobin พบครั้งแรกในครอบครัวของชาวจีน และพบใน Thalassemia

Hemoglobin I พบในครอบครัวของ

American Negro Hb. I นี้จะ move คล้ายกับ Hb.H

Hemogolobin J พบในปี 1956 ในพวก American Negro, Indonesians และ Canadian แต่ Hb.J ไม่ทำให้เกิดโรค

Hemoglobin K Hb.K นี้บางคนก็เรียกว่า Hb.I หรือ Ab.J ตอนหลัง Robinson ได้ตกลงเรียกว่า Hb.K Hb.K นี้จะพบแถวอาฟริกาเหนือ, สิงปโปร์ และอินเดียตะวันออก

Hemoglobin L Agar และ Lechmann ได้รายงานว่า Hb.L นี้ พบในรัฐบันจาบ ฮินดูในประเทศอินเดีย

Hemoglobin M พบในพวกกรรมพันธุ์ Singer ได้แยก Hb.M โดยใช้ Filter paper electrophroesis พบว่า Hb.M move คล้ายกับ Hb.A ทั้งสองสามารถแยกออกจากกันได้โดยวิธี Starch Block method.

Hemoglobin N ในปี 1959 Trincao ได้รายงานการพบ Hb.N ในประเทศโปรตุเกสและเกาะนิวกินี

Hemoglobin O พบในประเทศอินโดนีเซีย Eng. เป็นคนพบคนแรก

Homoglobin P ส่วนมากพบในพวก Negroes

Hemoglobin Q พบรวมไปกับ Hb.A จะพบมากในชาวจีนและสิงค์โปร์ Hb.Q นี้จะ move คล้ายกับ Hb.L

และยังมี Hemoglobin อื่นๆ ที่ได้รายงานเอาไว้ เช่น Norfolk, Hopkin I, Hopkin II, Bart's, Alexandra, Sount Vietnam, Lepore และ Durham I

Hemoglobin ที่ทำให้เกิด Thalassemia คือ Hb. E, Hb. s ส่วน Hemoglobin ที่ทำให้เกิด Anemia ได้แก่ Hb.F, Hb.S, Hb.C, Hb.D, และ Hb.E

Ref. Nomenclature of Abnormal Hemoglobin (J.A.M.A.174:1845,1960)

Identification of Abnormal Hemoglbin.

Group 1 Hemoglobin moving slowly than S:- C, E, A_2. etc.

Hb.C และ E สามารถจะแยกออกจาก A ได้โดยใช้ Buffer pH.6.5 แต่ AE รวมกันจะ move ช้าลง และ AC รวมกันจะ move เร็วขึ้นกว่า AS รวมกันซึ่งสามารถจะแยกได้โดย ion exchange chromatography.

E และ A_2 A_2 ปกติจะมีไม่เกิน 4% ถ้าสูงกว่านี้ก็เป็น Thalassemia และจะไม่สูงกว่า 15% มักจะต่ำกว่า 10% ส่วน Hb.E จะมีค่าไม่ต่ำกว่า 20%

Group 2. Hemoglobin moving like S:- D

Hb. S และ Hb.D จะ move ไปเท่าๆ กัน และสามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ Itano's solubility test

Group 3. Hemoglobin moving between Sand A:- F, G, L, P.

เราสามารถจะแยกออกจากกันได้โดยวิธี ion exchange chromatography ส่วน Hb.F เมื่อรวมกับ A หรือ S ไม่สามารถแยกออกออกมาได้ แต่ถ้า F รวมกับ A จะ move ช้ากว่า A อย่างเดียว และ F รวมกับ S จะวิ่งได้เร็วกว่า S อย่างเดียว ถ้าเอา A, S, F รวมกัน A กับ F จะ move รวมกันไป ส่วน S จะแยกไปต่างหาก

Group 4 Hemoglobin moving like A:-M,F เมื่อรวมกับ A

ทั้ง M และ F จะแยกออกจาก A โดยใช้ Spectrum, m จะมองเห็นด้วยตาเปล่า ส่วน F จะมองไม่เห็นเพราะอยู่ใน Ultraviolet range.

Group 5 Hemoglobin moving faster than A:- J,K.H.

ที่ pH. 6.5 J จะ move คล้าย A, move คล้าย A, Novfolk จะแยกออกจาก A และ N ก็จะแยกออกจาก A ส่วน H จะ move เร็วกว่า A ไปทาง Anode ส่วน Bart'S จะรวมไปกับ F จะแยกออกจากกันได้โดยใช้ Alkaline Resistant

Cellulose acetate Electrophoresis.

J-kohn ได้แนะนำให้ใช้ตั้งแต่ปี I958-1960 Principle ของวิธีนี้ก็เหมือนกับ paper electrophoresis เราใช้ cellulose acetate เป็น supporting medium แทนกระดาษกรอง ซึ่งวิธีนี้ก็ได้รู้จักกันทั่วไปแล้ว

ข้อแตกต่างใน เทคนิค และ เครื่องมือ ขนาดและชนิดของ supporting medium ละเอียดบางและใช้ส่วนน้อย ซึ่งดีกว่า Filter paper และจะเห็น Zone Electrophoresis ชัดมากเพราะ

1. มีการดูดซึมน้อย จากผลอันนี้จะไม่ยุ่งยากสำหรับ tailing คือจะไม่มี tailing เกิดขึ้น จะเห็น band ชัด ซึ่งแยกจาก band อื่นๆ ชัดเจน ดูง่าย

2. จะเห็นเนื้อ cell เป็นเนื้อเดียวกัน จะไม่มี hemicellulose และ lignins ซึ่งเป็นเหตุผลอันดีในการแยก

3. Alpha I จะแยกออกจาก Albumin ได้อย่างดี

4. การแยกก็เร็ว และช่วยประหยัดเวลาและวัตถุ

5. ใช้จำนวนของ protein เพียงเล็กน้อยก็จะสามารถแยกได้อย่างดี

6. เห็นเส้นชัด

7. สามารถใช้ในตัวเองหรือรวมกับวิธี Immuno-diffusion technique

8. เป็นวิธีที่เหมาะ มาก ใน การ ศึกษา Electrophoretic และ immuno-diffusion ใน Isotope labelled protein.

9. ง่ายต่อการจะตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ภายหลังจาก protein ได้แยกแล้ว

10. protein จำนวนน้อยๆ ก็สามารถแยกออกมาเห็น pattern ชัดเจน

11. การย้อมGlyco-protein จะแยกจาก globulin fraction.

12. Protein ที่ไม่อาจแยกได้ดีบนกระดาษกรองจะสามารถแยกได้ บน cellulose acetate เช่น Insulin และ lysozyme

จากเหตุผลทั้งหมดนี้ เราพูดได้ว่าเป็นเครื่องมือที่เหมาะสำหรับ Biochemist มากที่สุด

แบบ small scale Electrophoresis ความมุ่งหมายส่วนใหญ่สำหรับทำ Routine เพราะรวดเร็ว, ชัด และประหยัด

วิธี Large scale เหมาะในทาง Reserch เพราะทำได้หลายๆ Strip ซึ่งเหมาะแก่การศึกษาจำนวนมากๆ ของสารที่เราจะมาแยก

Apparatus for Cellulose Acetate Electrophoresis.

1. Horizontal electrophoretic tank ประกอบด้วย cathode และ anode, buffer ซึ่งจะแยกออกจากกันได้ เป็นพวก glass หรือ Perspex plane ไว้สำหรับวาง Strip. Strip นี้ทำให้ร้อนโดยผ่านกระแสไฟเข้าไป ซึ่งสามารถจะเปลี่ยนอุณหภูมิต่างๆ ได้ อุณหภูมิจะเริ่มอุ่นตั้งแต่ บริเวณ จุด กึ่ง กลาง ของ Strip และค่อยๆ เย็นออกไปถึง Buffer ข้าง tank จะมีปุ่มสำหรับปรับกระแสไฟได้ ซึ่งจะเป็นผลให้เกิดการแยกของสารขึ้น โดยอาศัย cellulose acetate membrane เป็น supporting medium.

เครื่องมือทั่วๆ ไปมี ขนาด ต่างๆ กัน เครื่องมือบางอัน สามารถ จะ ใช้ กับ filter paper electrophoresis ได้ด้วย เครื่องมือนี้เป็นแบบ horizontal ซึ่งส่วนมากทำจาก Perspex มีส่วนประกอบ 4 ส่วน คือ 2 ส่วนด้านในสำหรับใส่ electrode และ มี ที่ใส่ Buffer 2 อัน ข้างนอกจุดกึ่งกลางจะแยก Anode จาก Cathode สองอันหลังจะแยก electrode ออกจากส่วนประกอบข้อง Buffer ซึ่งBuffer นี้จะต้องใส่เข้าไปให้เต็ม compart-

ment เพื่อจะเชื่อมโยงระหว่าง electrode และ buffer โดย Cotton-wool wick.

นอกจากนี้จากจุดบนสุดจะมี ช่อง ซึ่งจะมีน้ำเต็ม และมีฟองน้ำสำหรับกันหยดน้ำที่จะตกลงไป และป้องกันการระเหยด้วย

2. Fitments หรือเรียกว่า Frame or Bridge ประกอบด้วย Strip support 2 ชิ้น ซึ่งเชื่อมมดย Perspex มี gab ขนาด 8–10 cm. สำหรับใช้กับ strip ที่มีขนาด 10–12 x 5 cm.

3. Strip holders ทำง่ายๆ จากการบีดท่อ perspex แล้วตัดให้เป็นท่อนๆ Strip holder นี้ต้องอยู่ข้างในผิว

4. Electrode ทำจาก platinum wire แต่อย่างอื่นก็ทำได้มี Carbon eleotrode แต่ไม่นิยมใช้ electrode นี้จะวิ่งผ่านไปตลอดความยาวของ compartment นั้น

5. การ Setting เครื่องมือ

1. ใส่ buffer ลง combartment ลึก 2 cm.

2. เบีด buffer ไปยัง Tank และปล่อยให้ไหลกลับไปอีก

3. ใส่สำลีอุดรูไว้

4. ใส่ Bridge

5. วาง Strip holder ใน buffer ให้เบียก แล้วไปวางบน bridge แล้วเปลี่ยนบ่อยๆ

6. ต่อไปยัง Power supply

7. เบีด Switch เพื่อให้กระแสไฟผ่านและตรวจดูไฟบ่อยๆ

8. ระวังฟองน้ำต้องเบียกและปล่อยให้แห้งได้เป็นบางครั้ง

เครื่องมือต้องล้างด้วยน้ำ สำลีที่อุดเปลี่ยนทุกครั้ง และตรวจดู electrode เสมอ

6. Cellulose Acetate Membrane Filter Strip มีคุณสมบัติทาง physical

1. สีขาว, เรียบ

2. มีความหนาประมาณ 130 microns

3. มีรูขนาด 0.5–3.0 micron

4. มีความทนทนต่อความแห้ง

5. สะท้อนแสงได้

6. สามารถ absorp เอาแสง Ultraviolet ไว้ได้

7. ระหว่างเบียกถึงแห้ง ใช้ratio 2.3:1 และมีความต้านทานต่อกระแสไฟฟ้า เมื่อ pH 8.6

Chemical composition.

1. มีส่วนประกอบของธาตุอื่น รวมอยู่บ้างเล็กน้อย เช่น Na, K, Ca, Fe, Cu, Pb,

Mn, Ni, Co, Zn Cr, Tin, Ag, molybdenum.

2. มี Nitrogen content ไม่มี affect ต่อ Alcohol, ether benzene และกรดที่เจือจาง

3. ละลายได้ใน phenol, acetone และ mixture ของ

1. Methylene chloride 90%, ethanol 10%
2. Chloroform 90%, ethanol 10%
3. Methylene chloride 50%, acetone 50%.

ขณะนี้ในห้อง Lab. ใช้ Sepraphore III Cellulose Polyacetate ของบริษัท Gelman มีขนาด 5×17 cm. Sepraphore III จะใช้ได้หลาย band แต่ละ band จะ clear และ sharp และไม่มี Tailing ของแต่ละ fraction เกิดขึ้น วิธีการทำง่าย, เร็ว, ผลก็อ่านง่าย การ Scaning ก็ง่าย เพราะแต่ละ band จะแยกกันชัดเจนดีมาก ผลที่ได้ก็ accurate ที่สุด

7. Buffer Solution

T.E.B. Buffer for cellulose acetate.

Tris crystat 242 gm.
Disodium E.D.T.A. 3.13 gms.
Boric acid 1.84 gms.
Distilled water 2,000 c.c.

มี pH 8.6

8. Hemoglobin solution.

1. Centrifuge 5 ml. ของ Oxalate Blood เพื่อเอา blasma ออก แล้วล้างเม็ดเลือดแดงออกด้วย saline 3 ครั้ง เพื่อ remove protein ออก หลังจาก centrifuge ครั้งสุดท้ายแล้วเท supernatant ออก จะเหลือแต่เม็ดเลือดแดง

2. เติมน้ำกลั่นลงไปเท่ากับจำนวนเม็ดเลือดแดง แล้วเติม 0.4 ml. ของ Toluene เพื่อ remove cell membrane ออกให้เหลือแต่น้ำเลือดจริง ๆ แล้วเขย่าอย่างแรง นำไป Centrifuge อีกครั้งหนึ่ง ใช้เวลา 15นาที

3. Remove cell membrane ซึ่งจับกับ Toluene ข้างบน โดยใช้สำลีพันปลายไม้ Swab

4. แล้วกรอง Solution ด้วย Whatman No. 44 filter paper ส่วน filtrate จะใส่เป็น Hemolysate

9. การเตรียม Strip ใช้ Strip ขนาด 5×17 cm.

10. Marking Strip วัดจากปลายข้างหนึ่งของ Strip มา 5 cm. ขีดเส้น strat line โดยใช้ดินสอดำ แล้ว Lebelled ชื่อหรือ No.

ให้ชัดเจน

11. Current Supply กระแสไฟที่ผ่านต้องคงที่ตลอดเวลา ประมาณ 500 V. หรือ 20 mA. ปกติใช้ 0.4-0.5 m A/cm.

12. Electrophoretic run. เวลาที่run จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ Buffer และกระแสไฟที่ผ่าน ปกติถ้าใช้ Buffer pH 8.6 ไฟที่ผ่าน 0.4 mA/cm. ใช้เวลา 2 ชั่วโมง แต่ที่ทำอยู่ห้อง Lab. ใช้กระแสไฟ 0.4 mA/cm. width (ของความกว้าง) หรือ 20-50 mA/5-7 cm. length โดยให้ Voltage คงที่ ประมาณ 300-500 Volt. ใช้เวลา 45 นาที (Beckman Duostat.)

13. Sprectrophotometer (Beckman D.U.) ใช้ wavelength 410 mu. เพื่อหาปริมาณของ Pattern และคิดเป็น Percentage ออกมา

Procedure.

1. เอา Sepraphore strip ใช้ดินสอดำขีดเส้น starting line ให้ห่างจากปลาย 5 cm. เป็นเส้นตั้งฉาก และ Lebelled ให้ชัดเจน

2. จุ่ม Sepraphore strip ลงใน Buffer ให้ทั่ว แล้ววางบน Plate.

3. ใช้ Micropipette ดูด Hemolysate solution ใส่ Applicator 2-4 microliters.

4. แตะ Applicator ลงบน Starting line

5. วาง Sephraphore strip ใน Electrophoretic chamer และตรึงด้วย Magna-Grip อย่าให้ Strip จุ่มใน Buffer

6. ปิดฝา แล้วปล่อยให้กระแสไฟผ่าน จะมีการ move ของแต่ละ fraction เกิดขึ้น ใช้เวลาในการ run. 30-40 นาที ก็จะเห็น fraction complete.

7. นำเอา Strip ออกจาก chamber ดู Fraction ออกแต่ละชนิดจะ migrate ไปได้เร็วต่างกัน แล้วอ่านผลออกมาว่าเป็นชนิดไหน โดยให้ fraction ของ Hp. A เป็น Standard.

8. วาง Strip ลงบน Pad. ใช้มีดที่คมตัดส่วนที่เป็น Fraction มากๆ ก็เป็น major ส่วนที่น้อยก็เป็น minor ส่วนที่เป็น major ใส่ใน tube ที่มี Dist. water 10 ml. ส่วน minor ใช้ Dist. water 2 ml.

9. เขย่าให้ fraction ที่ติดอยู่ที่ Strip clear ด้วยเครื่อง Vortex-Genie.

10. นำไปอ่าน ค่า Optical density ด้วย Spectrophotometer (Beckman D.U.) ใช้ Wave length 410 mu. เพื่อหาปริมาณ

ของแต่ละ fraction ทั้ง major และ Minor อ่านค่า O.D. ของ Major แล้วคูณค่าที่อ่านได้นี้ด้วย 5 อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ Distilled water เป็น standard

11. คิดหา Percentage ของ Minor ออกมา

Percentage of abnormal Hemoglobin in 170 samples

Kind of Hemoglobin	Total number	Percentage of Total
Hb. A,A	133	78.23
Hb. A, E	20	11.76
Hb. A, F	1	0.59
Hb. A, H	5	2.94
Hb. F & Bart's	9	5.29
Hb. E+F	2	1.18

Result and Discussion.

จากการใช้ Hemolysate แยกชนิดของ Hemoglobin โดยใช้ cellulose acetate strip เป็น supporting medium จะเห็นได้ว่าการ migrate ของแต่ละ fraction แตกต่างกันแล้วแต่ Electrical charge และกระแสไฟฟ้าที่ผ่าน เช่น Hb. A จะ migrate ไปทางขั้วบวก ส่วน Hemoglobin อื่นๆ ที่เหลือจะ migrate มาทางขั้วลบ เราเรียกว่า Slow moving เช่น Hb. A_2 D และ E พวกนี้จะ move ช้ากว่า Hb. A โดยเอา Hb. A เป็นหลัก ส่วน Hb. F, Bart's, H จะ move ได้เร็วกว่า Hb. A ไปทางขั้วบวก เรียกว่า Fast moving แต่ละ fraction จะเห็น Zone แยกกันชัด เมื่อ run บน Cellulose acetate และ pH ของ Buffer ที่ใช้คือ 8.6 ซึ่งเราสามารถจะแยก Hemoglobin อื่น ๆ ได้เช่น A, C, D, H, S และ A_2 นอกจากนี้เรายังสามารถจะทราบความแตกต่างของ Hemoglobin ซึ่งมี mobilities คล้ายกับที่ pH 8.6 เช่น Hb. E, A_2 หรือ S และ D ได้

จากการแยกชนิด Hemoglobin ทั้งหมด

170 คน จะพบว่ามี Hemoglobin AA 133คน และหาค่า Range ของ A_2 ได้ 0.5–4.5% ของ Hemoglobin ทั้งหมด หา Mean Percentage ได้ 1.36% และ Standard deviation $\pm$ 0.73, Standard error 0.063 ซึ่งแสดงว่า ค่า mean percentage ของ Hemoglobin A_2 น้อยกว่าค่า mean percentage ของ Hemoglobin ในรายงานที่ คนอื่น ที่ได้ศึกษามาก่อนเล็กน้อย ความแตกต่าง หรือ ความผิดพลาดนี้ อาจ จะเนื่องจาก

1. การแยกของ Hemoglobin A และ A_2 ไม่ Complete

2. การตัด Band ของ Hemoglobin แต่ละชนิดไม่หมด

3. Hemoglobin fraction ละลายในน้ำกลั่นไม่หมด จึงทำให้ค่าผิดไปบ้าง

4. ความสัมพันธ์ ระหว่าง ปริมาณของ Hemoglobin concentration กับค่า Optical density ปกติจะเป็นเส้นตรง จะโค้งและบ่ายเบนจาก Beer-Lambert's law จึงทำให้ค่าที่ได้ผิดไป

Percentage of Hemoglobin A_2 in normal persons.

Authors	Date	Techniques	No.	Mean	% Range
Kunkel and Wallenius	1955	Starch Block	26	2.6	1.8–3.5
Masri Josephson & Singer	1958	Starch Block	200	2.6	1.2–3.5
Gerald & Diamond	1958	Starch Block	20	2.4	1.7–3.1
Ibbotson & Crompton	1961	Filter paper	86	3.2	1.4–4.3
Hilgartner, Erlandson, Walden	1961	Filter paper	22	9.9	5.0–14.3
Afonso	1962	Cellulose acetate	40	2.6	1.4–3.8
Petrakis et al.	1962	Cellulose acetate	28	3.5	1.5–6.1
Bartlett	1963	Cellulose acetate	17	2.5	1.8–3.2
Graham & Grunboum	1963	Cellulose acetate	64	2.8	1.1–4.5
A.J. Marengo–Rowe	1965	Cellulose acetate	67	2.0	1.0–3.0
Present investigation	1967	Cellulose acetate	133	1.36	0.5–4.5

Conclussion

จากการทำ Hemoglobin Electrophoresis on cellulose acetate method ในคน 170 ราย ตรวจพบดังนี้

Hemoglobin AA 133 ราย คิดเป็น Percentage ได้ 78.23% ของ Hemoglobin ทั้งหมด

Hemoglobin AE 20 ราย คิดเป็น Percentage ได้ 11.76% ของ Hemoglobin ทั้งหมด

Hemoglobin AF 1 ราย คิดเป็น Percentage ได้ 0.5% ของ Hemoglobin ทั้งหมด

Hemoglobin AH 5 ราย คิดเป็น Percentage ได้ 2.94% ของ Hemoglobin ทั้งหมด

Hemoglobin F& Bart's 9 ราย คิดเป็น Percentage ได้ 5.29% ของ Hemoglobin ทั้งหมด

Hemoglobin E. F 2 ราย คิดเป็น Percentage ได้ 1.18% ของ Hemoglobin ทั้งหมด

Hemoglobin AA_2 (Fig. 1) Hemoglobin จะ move ไปทางขั้วบวก ส่วน Hemoglobin A_2 จะ move ช้า มาทางขั้วลบ ปกติจะมี Hb. A 95% และ A_2 ประมาณไม่เกิน 3.5% ถ้า Hemoglobin A_2 สูงกว่านี้ก็แสดงว่าเป็น Thalassemia Trait ซึ่งจะพบมากใน Negroes.

Hemoglobin AE (Fig.2) Hemoglobin E จะ move ช้ากว่า A มาทางขั้วลบ และจะ move คล้ายกับ A_2 ซึ่งจะแยกออกจากกันได้ โดยดู fraction ของ Hb. E จะมี Percentage สูงกว่า A_2 ประมาณ 20% ขึ้นไป ส่วน A_2 จะไม่มีเกิน 10% Hb. AE นี้เรียกว่า Hb. E trait หรือ Heterozygous AE ซึ่งพบในคนไทยประมาณ 12% และพบแถวอาเซียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า, ซีลอน

Hemoglobin AF (Fig. 4) Hemoglobin F จะ move คล้าย Hb. A หรือเร็วกว่าเล็กน้อย จะเห็น fraction ติดกับ Hb. A เราจะแยกออกจากกันได้ โดยใช้ Alkaline Resistant โดยที่ Hb. F จะไม่ละลายในด่าง ส่วน Hb. A จะละลายในด่าง ปกติในคน Adult จะพบ Hb. F ประมาณต่ำกว่า 2% แต่จะพบในเด็กเกิดใหม่ประมาณ 50–70% หลังคลอดออกมาแล้ว Hb. F จะลดลงเรื่อยๆ จนอายุ 1–2 ปี จะมี Hb. F ปกติคือไม่เกิน 2% ถ้าพบ Hb. F สูงในเด็กหรือในผู้ใหญ่ถึง 20% ก็เป็น Homozygous Thalassemia ถ้าสูงกว่า 20% ขึ้นไปก็เป็น Heterozygous Thalassemia และ Hb. F นี้จะสูงใน Sickle cell

Anemia ด้วย

Hemgolobin F & Bart's Hemoglobin Bart's เป็น fast moving จะ move ไปเร็วกว่า Hb.F และจะ move คล้ายกับ Hb.H หรือช้ากว่าเล็กน้อย ซึ่งจะแยกออกจากกันได้โดยวิธี Alkaline Resistant ส่วนมากมักพบในเด็กๆ Hb. Bart's พบได้ในเปอร์เซ็นต์สูงกว่า Hb.F จะทำให้เด็กตายก่อนกำหนด มีอาการซีด ท้องโต แต่ผู้ใหญ่บางคนก็อาจพบ Hb. Bart's ด้วย และอาจจะมีชีวิตอยู่ได้

Hemoglobin AH Hemoglobin H. move เร็วกว่า Hb.A ไปทางขั้วบวก เรียกว่าเป็น Fast moinng พบในคนไทยมากกว่าชาติอื่นๆ(6%) และพบร่วมกับ Thalassemia gene เรียกว่า Thalassemia Hb. H

Hemoglobin E+F Hemoglobin F จะ move เร็วกว่า Hb.E ไปทางขั้วบวก ซึ่งจะ move คล้ายกับ Hb.A แต่เรามักจะพบเปอร์เซ็นต์ของ Hb.E มากกว่า 50% ขึ้นไป และมี Hb.F อยู่ข้างหลังซึ่งมีเปอร์เซ็นต์น้อยกว่า เรียกว่า Hb.E Thalassemia มักจะพบในเด็กๆ

และยังมี Hemoglobin อื่นๆ อีก เช่น S, D, C, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, Norfolk, Hopkip I Hopkin II, Alexandra, Sount. Vietnam, Lepore และ Durham I.

Hemoglobin ที่ทำให้เกิด Anemia คือ พวก Hb.E, Hb.F, Hb.S, Hb.C, Hb.D.

Hemoglobin ที่ทำให้เกิด Thalassemia คือ Hb.E, Hb.S, Hb.A_2

Hemoglobin ที่พบในเมืองไทยคือ Hb. E, Hb.F, Hb.H, Hb.Bart's, J,D และ Q

Electrrphoresis on cellulose acetate method เป็นวิธีง่าย สดวก และรวดเร็ว และได้ zone electrophoresis ชัด ในการแยกชนิดของ Hemoglobin จะเห็น fraction ชัดเจน ไม่มี Tailing เกิดขึ้น ผลที่ได้ก็ Accurate มาก และความผิดพลาดน้อยมาก จากการหา Normal Values ของ Hb.A_2 ของคน Normal 133 คน จะได้ค่า Normal Range 0.5 – 4.5 % และค่า Mean Percentage ได้ 1.36, Standard deviation $\pm$ 0.073 เมื่อเทียบกับ Normal range ของคนอื่นที่ได้ศึกษามาก่อน ก็มีค่าใกล้เคียง และ Range กว้างกว่า คือตั้งแต่ 0.5–4.5% วิธีนี้จึงเหมาะที่สุดที่จะใช้ศึกษาและค้นคว้าในการแยกสารต่างๆ ถึงแม้จะมีจำนวนน้อยๆ ก็สามารถแยกได้ และใช้เวลาสั้นประมาณ 45 นาที ก็อ่านผล ซึ่ง

เมื่อเทียบวิธี Paper electrophoresis ซึ่งกินเวลานาน และมักมี Tailing ผลที่ได้ไม่ accurate ซึ่งผิดกับวิธีนี้ ในการหาปริมาณของสารก็ทำได้ง่ายและสดวกในการ Scan. ไม่ต้องย้อมสีก็เห็นชัด เพราะไม่มี Tailing ผลที่ได้ก็ Accurate มาก จึงเป็นวิธีที่เหมาะที่สุดสำหรับ Biochemist. ทั้งหลาย ที่จะใช้ทั้ง Routine Lab. และด้าน Research

Refference

1. Itano., H.A. Arch. Biochem. 47:148, 1953.

2. Kunkel, H.G. and Wallenius G. 122, 288, 1955.

3. Masri, M.S. Josephson, A.M. and Singer, K 1958. Blood 13, 533

4. Gerald, P.S. Blood, 936, 1958

5. Lechman, H, and Agar. J. A M. (1961)

6. Kohn J. (1958). Trans. roy Soc. Trop. Med. Hyg. 52, 304

7. Kohn J "A Micro-electrophoretic Method" Nature 1958, 181, 839

8. Afonso. E. Clinical chem. Acta 7, 545, 1962

9. Graham. J.L. and G rumbaum, B. W. Amer. J. clin. Path., 39, 567 (1963)

10. Cellulose acetate membrane electrophoresis. Kimura J. clin. Path. 12. 477-82 Sep. 64

11. Scand. J. clin., Lab. Invert. 15:98-101, 1663

12. Nomenclature of Abnormal Hemoglobin (J.A.M.A. 174: 1845, 1960)

Abstract

HEMOGLOBIN ELECTROPHORESIS ON CELLULOSE ACETATE IN CHIANG MAI MEDICAL STUDENTS AND PATIENTS.

Jumrussri Kasemsawatdi, B.S. (M.T.) *

The Hemoglobin Electrophoresis by the cellulose acetate method of 170 cases of Chiang Mai Medical Students and Patients, Chiang Mai Hospital have been determined. The percentage of hemoglobin detected by this method is 78.23 (133 cases) for hemoglobin AA, 11.76 (20 cases) for hemoglobin AE, 0.5 (1 case) for hemoglobin AF, 2.94 (5 cases) for hemoglobin AH, 5.29 (9 cases) for hemoglobin F & Bart's and 1.18 (2 cases) for hemoglobin EF.

Electrophoresis by the cellulose acetate method is simple, accurate and can be done in a short time. The fraction on hemoglobin cellulose electrophoresis is clear and no tailing appears. Detected normal values of hemoglobin A_2 of 133 cases ranged from 0 5 to 4.5 %, Mean Percentage is 2.36 and Standard Deviation 0.073.

This method is appropriate for study and research in electrophoresis. Although the sample to be tested is small in amount, the fraction of hemoglobin is detectable and the result can be read in 45 minutes.

In comparing this method with the Paper Electrophoresis method, the latter is more time consuming and tailing and more errors appeared in the fraction.

* Central Lab., Khon Khan Hospital.