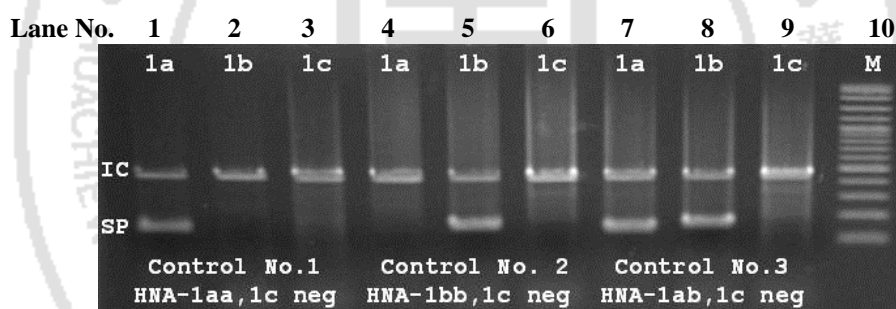


## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในตัวอย่างควบคุมโดยวิธี PCR-SSP ที่ปรับปรุงขึ้น

คณะผู้วิจัยได้ปรับปรุงวิธี PCR-SSP ของ Han TH และคณะ เพื่อใช้ในการตรวจหาฮีน HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม (control DNA) ที่ทราบชนิดของ แอนติเจน HNA-1 จำนวน 3 ราย มาทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Han TH *et al.* 2006) ผลการตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 439 base pair (bp) ซึ่งจำเพาะต่อ human growth hormone (HGH) สำหรับเป็นแถบควบคุมภายใน (internal control; IC) ของทุกหลอดทดลอง และตรวจพบ แถบดีเอ็นเอขนาด 141, 156 และ 191 bp ที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c ตามลำดับ ในแต่ละหลอดทดลองซึ่งให้ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ถูกต้องและตรงกับผลที่ได้จากการ ตรวจด้วยวิธี sequence based typing (SBT) (รูปที่ 4.1)



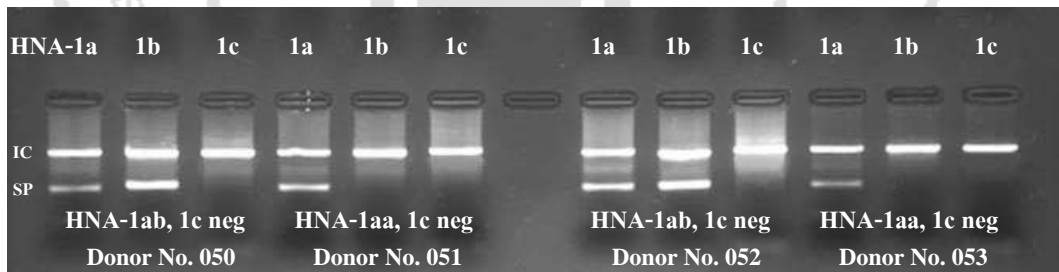
รูปที่ 4.1 ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ของตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมด้วยวิธี PCR-SSP

จากรูป **แถวที่ 10** แสดงแถบของ molecular weight marker (M) โดยใช้ 100 bp-DNA ladder marker (VC 100 bp DNA Ladder, Vivantis, Malaysia) ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ของดีเอ็นเอควบคุม จำนวน 3 ราย พบแถบดีเอ็นเอขนาด 439 bp ที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control; IC) ของทุกหลอดทดลอง **แถวที่ 1 ถึง 3** แสดงผลการตรวจของตัวอย่างควบคุม หมายเลข 1 ซึ่งพบแถบของ allele-specific primer (SP) ขนาด 141 bp เฉพาะแถวที่ 1 ซึ่งเป็นหลอดทดลองที่มีไพรเมอร์สำหรับ HNA -1a อยู่ จึงแปลผล HNA-1 genotype เป็น HNA-1aa, 1c negative **แถวที่ 4 ถึง 6** แสดงผลการตรวจของตัวอย่างควบคุม หมายเลข 2 ซึ่งพบแถบของ SP ขนาด 156 bp เฉพาะแถวที่ 5 ซึ่งเป็นหลอดทดลองที่มีไพรเมอร์สำหรับ HNA -1b จึงแปลผล HNA-1 genotype เป็น HNA-1bb, 1c negative **แถวที่ 7 ถึง 9** แสดงผลการตรวจของตัวอย่างควบคุม หมายเลข 3 ซึ่งพบแถบของ SP ขนาด 141 และ 156 bp ในแถวที่ 7 และ 8 ซึ่งเป็นหลอดทดลองที่มีไพรเมอร์ สำหรับ HNA -1a และ -1b ตามลำดับ จึงแปลผล HNA-1 genotype เป็น HNA-1ab, 1c negative

#### 4.2 ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในตัวอย่างดีเอ็นเอของประชากรเชื้อชาติไทยแท้

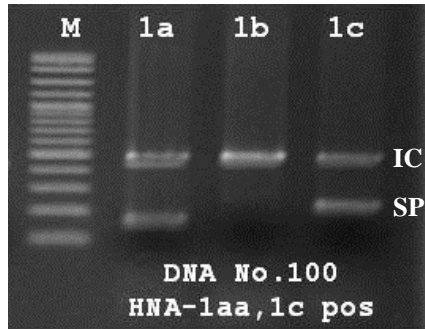
คณะผู้วิจัยได้นำวิธี PCR-SSP ที่ปรับปรุงขึ้นไปใช้ในการตรวจหา HNA-1 genotype ของตัวอย่างดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดประจำที่มีเชื้อชาติไทยแท้ของโรงพยาบาลระยอง จำนวน 230 ราย (รูปที่ 4.2 และ 4.3) เมื่อนำผลการตรวจหา HNA-1 genotype มาตรวจสอบความสมดุลของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยตามกฎของ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้อยู่ในภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg ( $p$ -value = 0.885) (ตารางที่ 4.1) กลุ่มตัวอย่างที่ใช้มีขนาดและการแสดงลักษณะฟีโนทัยป์ (phenotype) ที่เหมาะสม (goodness of fit)

ผลการทดลองพบการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ในประชากรไทยแท้ จำนวน 230 ราย คิดเป็นร้อยละของการแสดงออกทางฟีโนทัยป์แบบ HNA-1aa เท่ากับ 55.21 ฟีโนทัยป์แบบ HNA-1ab เท่ากับ 33.91 ฟีโนทัยป์แบบ HNA-1bb เท่ากับ 10.43 และฟีโนทัยป์แบบ HNA-1null เท่ากับ 0.43 (ตารางที่ 4.1) จากลักษณะการแสดงออกข้างต้น ส่งผลให้พบความถี่ของอัลลีล HNA-1a ในประชากรชาวไทยแท้มากกว่าสองเท่าของ HNA-1b โดยพบความถี่ของ HNA-1a เท่ากับ 0.722 และ HNA-1b เท่ากับ 0.274 (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่ความถี่ของ HNA-1c นั้นพบได้น้อยมาก (ความถี่เท่ากับ 0.009)



รูปที่ 4.2 ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้โดยวิธี PCR-SSP

จากรูป แสดงให้เห็นผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดประจำของโรงพยาบาลระยอง จำนวน 4 ราย ผู้บริจาคหมายเลข 050 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอทั้งในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a และ -1b มี HNA-1 genotype เป็น HNA-1ab, 1c negative ผู้บริจาคหมายเลข 051 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอเฉพาะในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a แปลผลเป็น HNA-1aa, 1c negative ผู้บริจาคหมายเลข 052 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอทั้งในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a และ -1b แปลผลเป็น HNA-1ab, 1c negative และ ผู้บริจาคหมายเลข 053 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอเฉพาะในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a แปลผลเป็น HNA-1aa, 1c negative



รูปที่ 4.3 ผลการตรวจหา HNA-1c ในดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้

จากรูป ดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้หมายเลข 100 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a และ -1c แปลผล HNA-1 genotype เป็น HNA-1aa, 1c positive

ตารางที่ 4.1 การทดสอบ Hardy–Weinberg Equilibrium ของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ จำนวน 230 ราย

Genotypes	Number (%)	Observed frequency	Expected frequency	H-WE analysis
HNA-1aa	127 (55.21)	0.552	0.523	$\chi^2 = 0.021$ $p\text{-value} = 0.885$
HNA-1ab	78 (33.91)	0.339	0.397	
HNA-1bb	24 (10.43)	0.104	0.075	
HNA-1null	1 (0.43)	0.004		

ตารางที่ 4.2 ความถี่อัลลีลของ HNA-1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้

HNA-1 allele	Gene frequency (%)
HNA-1a	0.722
HNA-1b	0.274
HNA-1c	0.009
HNA-1null	0.004