บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Spencer และคณะ (1964) สามารถจำแนกรูปแบบ PGM_1 ด้วย อิเล็กโทรโฟริซิส บนสตาร์ชพบว่าจำแนกได้ 3 รูปแบบ คือ $PGM_1 1$, $PGM_1 2$ และ $PGM_1 2-1$ ตามลำดับ ต่อมาในปี 1968 Monn (Monn, 1968) ได้ใช้อะกาโรสเป็นตัวจุนแทนสตาร์ช ในการจำแนกรูปแบบของ PGM โดยอิเล็กโทรโฟริซิสภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงเริ่มด้วยการใช้อะกาโรสเป็นตัวค้ำจุนเป็นอันดับแรกด้วยเหตุผลที่ว่าอะกาโรสเป็นตัวกลางที่มี high gel strength แม้เมื่ออยู่ในความเข้มข้นต่ำ มีแรงต้านต่อการเคลื่อนที่ของชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ต่ำ ง่ายต่อการเตรียมและการแปรความหมายจากรูปแบบโปรตีนที่ทำได้ โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะแยกออกจากกันตามประจุสุทธิของตัวเองเพียงอย่างเดียว (Guiseley & Renn, 1975)

จากการทดลองจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนอะกาโรสพบว่า แถบไอโซไซม์ของ PGM ที่ได้มีลักษณะจางและแพร่กระจายกว้างมาก ทั้งนี้เนื่องจากตัวค้ำจุนอะกาโรสจะมีคุณสมบัติของ sieving effect ต่ำมาก เมื่อใช้เป็นตัวกลางในการจำแนกชีวโมเลกุลที่มีมวลน้อยกว่า $5x10^5$ ดาลตัน (PGM มีน้ำหนักโมเลกุล $7.4x10^4$ ดาลตัน) (Hayward & Smith, 1972) นอกจากนี้พบว่าในขณะทำอิเล็กโทรโฟริซิส ลักษณะของอะกาโรสทางขั้วบวกแห้งมาก ซึ่งจะมีผลไม่ดีต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีนผลอันนี้เนื่องมาจาก electroendosmotics

จากการเปลี่ยนไปใช้สารผสมระหว่างอะกาโรสและสตาร์ชในปริมาณอย่างละ 1% ได้ผลดีขึ้น ทั้งนี้เพราะ สตาร์ชอาจช่วยลด electroendosmosis ในอะกาโรส (Wraxall & Stolorow, 1986) คือ ลักษณะไอโซไซม์ทางขั้วบวกไม่แห้งมาก เกิดการแยกของไอโซไซม์ใน PGM_1 เป็น 4 แถบ (a,b,c,d) (รูปที่ 4) โดยที่ไอโซไซม์ d จะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด (ใกล้ขั้วบวกมากที่สุด) รองลงมาคือ ไอโซไซม์ c,b และ a (ใกล้ขั้วลบมากที่สุด) ตามลำดับ

ทำให้สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM_1 ออกได้เป็น 3 รูปแบบ คือ $PGM_1 1$, $PGM_1 2$ และ $PGM_1 2\text{-}1$ ดังเช่นรายงานของ Spencer และคณะ (1964) ซึ่งจากรายงานดังกล่าวพบว่า PGM_1 ทั้ง 3 รูปแบบนี้ถูกควบคุมโดย 2 autosomal codominant alleles คือ $PGM_1{}^1$ และ $PGM_1{}^2$

ถึงแม้การจำแนก PGM ด้วยอะกาโรส-สตาร์ชจะกระทำได้ง่าย ใช้กระแสไฟต่ำแต่รูปแบบ PGM ที่ได้ไม่คมชัด อ่านยาก และให้จำนวนรูปแบบน้อย ซึ่งส่งผลให้อำนาจในการแจกแจงของเอนไซม์ต่ำไปด้วยจึงเปลี่ยนไปใช้ระบบของโพลีอะคริลาไมด์แทน

จากคุณสมบัติของโพลีอะคริลาไมด์ในแง่ของ sieving effect และสามารถควบคุมขนาดของรูพรุนของเจลได้ โดยการแปรความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ จึงนำมาเป็นตัวกลางแทนอะกาโรส-สตาร์ช โดยคาดว่าจะสามารถป้องกันการแพร่กระจายของโมเลกุลของไอโซไซม์ อันจะทำให้แถบไอโซไซม์ที่ได้มีความคมชัดขึ้น และไม่เกิดการเกยทับของไอโซไซม์ด้วย จากการทดลองจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลประเภทต่อเนื่อง (Continuous gel electrophoresis) ที่ pH 7.4 โดยใช้ Tris-maleic ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์เดิมที่ใช้ได้ดีในระบบอะกาโรส-สตาร์ชเจล พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในอิเล็กโทรด และในเจล (สภาวะที่ 1 ในตารางที่ 1) ใกล้เคียงกันกับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในระบบอิเล็กโทรโฟริซิสแบบอะกาโรส และสตาร์ช (ข้อ 4.1) ความต่างศักย์ที่ได้ต่ำมาก ไม่เพียงพอที่จะขับดันให้โปรตีนและ PGM ไม่เคลื่อนที่เลย เมื่อลดความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในอิเล็กโทรดลง ศักดาไฟฟ้าเพิ่มขึ้น เล็กน้อยแต่การเคลื่อนที่ของโปรตีนและ PGM ยังเคลื่อนที่ได้น้อย ทั้งนี้อธิบายได้ว่า เพราะระบบโพลีอะคริลาไมด์มีความต้านทานสูงกว่าในระบบของอะกาโรสและสตาร์ชมาก และเมื่อเจือจางความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ลงไปอีก (สภาวะที่ 3 และ 4 ในตารางที่ 1) ความต่างศักย์สูงขึ้นมาก แต่ระบบบัฟเฟอร์ ไม่สามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่างได้ (pH ของบัฟเฟอร์ในสารละลายอิเล็กโทรดเปลี่ยนไปจาก 7.4 เป็น 10.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง) ระบบนี้จึงไม่สามารถใช้วิเคราะห์รูปแบบ PGM ได้

จึงทำการทดลองด้วยอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบไม่ต่อเนื่องที่ pH 8.9 ซึ่งเป็นระบบที่สามารถทำให้เลือดตัวอย่างปริมาตรสูงขึ้นได้อีก ทดลองควบคุมขนาดของรูพรุนโดยการแปรความ

เข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ พบว่า การแยกของ PGM โดยใช้ 10% T ซึ่งให้ resolution สูงที่สุด (รูปที่ 5) นั้น PGM สามารถแยกออกจากกันได้บ้างแต่ยังไม่ชัดเจน และ resolution ยิ่งต่ำกว่าผลจากอะกาโรสและสตาร์ชเจล ทั้งนี้อาจเนื่องจากไอโซไซม์ของ PGM นั้น มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน แต่จะต่างกันเล็กน้อยในประจุสุทธิ

นั่นคือ ระบบอิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลทั้งแบบต่อเนื่องที่ pH 7.4 และไม่ต่อเนื่องที่ pH 8.9 ไม่สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM ได้

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนและเอนไซม์ โดยอาศัยความแตกต่างในค่า isoclectric point (pI) ของโปรตีน และเอนไซม์ แต่ละชนิดแต่เพียงปัจจัยเดียว โดยที่การจัดตัวของ pH บนตัวค้ำจุนมีลักษณะเป็น gradient ซึ่งเกิดจากการเติมสารที่เรียกว่า แคริเออร์ แอมโฟไลท์ (carrier ampholytes) (Svensson, 1961) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น amphoteric ที่สามารถนำกระแสไฟฟ้า และรักษา pH ที่ต้องการไว้ในขณะเดียวกัน ด้วยวิธีการนี้โปรตีนและเอนไซม์จะถูกบีบให้อยู่ในแถบที่คมชัดขึ้นในบริเวณที่ pH มีค่าเท่ากับ pI ของมัน เป็นผลให้ได้การจำแนกเอนไซม์ตามค่า pI ของมัน อีกทั้งให้ resolution ดี ลดการแพร่กระจายของแถบโปรตีนและเอนไซม์ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟริซิส

ในการจำแนกรูปแบบของโปรตีนด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ทิศทางในการแยก (ตามแนวนอน, horizontal หรือแนวดิ่ง vertieal) และขนาดของเจล ล้วนแต่มีผลกับ resolution ของโปรตีนทั้งสิ้น ในขณะเดียวกันเจลขนาดใหญ่ต้องใช้สารเคมีจำนวนมาก ใช้เครื่องมือขนาดใหญ่ ค่าใช้จ่ายสูงตามไปด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเปรียบเทียบการทำไอโซอิเล็ก ทริกโฟกัสซิงด้วยเครื่องมือ 3 แบบด้วยกันคือ Vertical midget electrophoresis (VM-IEF) ซึ่งเป็นเจลขนาดเล็กแยกในแนวดิ่ง, Horizontal mini IEF (HM-IEF) เจลขนาดเล็กแยกในแนวนอน และ Horizontal chamber electrophoresis (H-IEF) ซึ่งเป็นเจลขนาดใหญ่ เพื่อเป็นการกำหนดวิธีการและเครื่องมือที่เหมาะสมที่สุดในงานพิสูจน์หลักฐานต่อไป

สำหรับการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยใช้ VM-IEF ขนาด 8 x 10 x 0.075 ซม. นั้น พบว่าสามารถจำแนก allozymes นี้ออกไปได้

ถึง 10 รูปแบบ (รูปที่ 7) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการจำแนก PGM ได้ข้อสรุปว่าผลการจำแนกจะดีที่สุดเมื่อ %T มีค่าระหว่าง 5.5-7.0 ปริมาณไฟฟ้าที่ 2,000 Volt-hour (500 โวลต์, เวลา 4 ชั่วโมง) เมื่อกำลังไฟฟ้าคงที่ที่ 30 วัตต์ (รูปที่ 7) เจลบาง 0.5 มม. และเตรียมเจลโดยการโพลีเมอไรซ์ด้วย 20 มก.% ไรโบฟลาวินและแสง การที่เจลที่บางให้ผลดีกว่านั้น เนื่องมาจากเจลบางจะมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ทำให้การกระจายความร้อนดีกว่าเจลหนา และมี Voltage gradient สูงกว่า ทำให้แถบไอโซไซม์มารวมกันเป็นแถบที่คมชัดขึ้น (Allen, 1980) จึงทำให้ resolution สูงด้วย

PGM ที่ได้จากการจำแนกด้วยเครื่องมือและวิธีการข้างต้นนี้ปรากฏเป็น 4 แถบคือ 1-, 1+, 2- และ 2+ โดยที่ไอโซไซม์ 1- จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ (pH 7) ได้เร็วที่สุดตามมาด้วยไอโซไซม์ 1+, 2- และ 2+ ตามลำดับ ทำให้สามารถอ่านรูปแบบของ PGM ได้ถึง 10 รูปแบบ ดังรายงานของ Bark และคณะ (1976) คือ 1+, 1-, 1+1-, 2+, 2-, 2+2-, 1+2-, 1+2+, 1-2- และ 1-2+ นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซไซม์ของ PGM_2 (e, f) ก็สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธีนี้

จากรูปที่ 7 จะพบว่าไอโซไซม์ 1+ และ 1- สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจนดีมากด้วยเครื่องมือและวิธีการนี้ แต่มีข้อเสียที่ การเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ในแต่ละรูปแบบไม่ consistant โดยมีการเคลื่อนที่เร็วกว่าเมื่อ apply เลือดตัวอย่างในช่องกลาง ๆ ของเจล อาจเนื่องมาจากระบบให้ความเย็นไม่สม่ำเสมอ Vertical midget electrophoresis นี้มีแต่ผู้นำไปใช้กับการทำอิเล็กโทรโฟริซิสเท่านั้น ไม่เคยมีผู้รายงานว่าใช้กับ IEF เลย การที่แถบไอโซไซม์แยกจากกันได้กว้างมากเช่นนี้ เป็นผลดีในการอ่านรูปแบบเอนไซม์เป็นอย่างยิ่ง ระบบนี้จึงควรได้รับการพัฒนาต่อไปในงานพิสูจน์หลักฐาน

สำหรับการจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยใช้ HM-IEF ขนาด 12.5 x 6.5 x 0.04 ซม. (ข้อ 4.3.2) พบว่าที่ 5.5% T, 4.5% C ปริมาณไฟฟ้า 525 Volt-hour โดยค่อย ๆ เพิ่มศักดาไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 15 นาที, 200 โวลต์ 15 นาที และ 450 โวลต์ 60 นาที พบว่ายังคงสามารถจำแนก PGM ออกได้เป็น 10 รูปแบบ (4 ไอโซไซม์ คือ 1+, 1-, 2+, 2-) เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับการ

แยกด้วย VM-IEF พบว่า การโฟกัสของแต่ละไอโซไซม์ดีขึ้น แต่แถบไอโซไซม์ 1-, 1+ และ 2-, 2+ แยกออกจากกันน้อยมาก (รูปที่ 8) อันนี้จะทำให้ผู้ทำการทดลองอ่านผลผิดพลาดได้ง่าย

จะเห็นว่า chamber ชนิด HM-IEF นี้ เราไม่สามารถเพิ่มระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดได้ การใช้ ampholine ที่มีช่วง pH แคบลงคือ pH 5.0-6.5 (รูปที่ 9) ก็ไม่ช่วยให้การจำแนกไอโซไซม์ 1+ ออกจากไอโซไซม์ 1- (ช่องที่ 3, 8) และ ไอโซไซม์ 2+ ออกจากไอโซไซม์ 2- (ช่องที่ 7) ได้เช่นกัน

Caspers และคณะ (1977) เป็นคนแรกที่เสนอให้ใช้ seperator ในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดย chemical spacers ซึ่งมีคุณสมบัติของ zwitterionic (amphoteric) ที่จะขยายค่า pH รอบ ๆ ค่า pI ของ spacer นั้นขึ้นอีกประมาณ 2 หรือ 3 หน่วย pH ทำให้มีระยะห่างระหว่าง pH ที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น จึงสามารถจำแนกไอโซไซม์ของเอนไซม์ที่มีค่า pI ต่างกันเพียงเล็กน้อยได้

จากการทดลองของ Gill และ Sutton (Gill & Sutton, 1985) พบว่า EPPS [N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N-3-propanesulphonicacid] ซึ่งมีค่า pK = 8.0 ที่ 25^{o}C สามารถใช้เป็น spacer ช่วยในการจัด pH ระหว่าง 5.6 ถึง 5.9 ให้กว้างขึ้น ทำให้ไอโซไซม์ 1+, 1- และ 2+, 2- ของ PGM_1 สามารถแยกออกจากกันได้

Sutton (Sutton, 1984) ได้ทำการทดลองหาค่า pI ของ PGM_1 และ PGM_2 โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าไอโซไซม์ 1+, 1- มีค่า pI ต่างกันเพียง 0.06 หน่วย และไอโซไซม์ 2+, 2- มีค่า pI ต่างกันเพียง 0.05 หน่วย pH เท่านั้น ดังนั้นการจำแนกแถบไอโซไซม์ดังกล่าวออกจากกันด้วย ampholyte เพียงอย่างเดียว จะมีประสิทธิภาพไม่ดีพอ

อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่ม 1.2% EPPS หรือ glycine ลงใน IEF-PAGE เดิมและแยกภายใต้ภาวะเงื่อนไขเดียวกับรูปที่ 9 พบว่าถึงแม้ช่วงห่างระหว่างแถบไอโซไซม์ต่าง ๆ กว้างมากขึ้น ก็ยังไม่สามารถจำแนกแถบของไอโซไซม์ 1+, 1- และ 2+, 2- ออกจากกันได้ แต่ไอโซไซม์ 1+, 1- และ 2+, 2- จะปรากฏเป็นแถบเดียวที่เข้มกว่าเดิม และ EPPS จะสามารถเพิ่มระยะห่างระหว่างไอโซไซม์ทั้งสี่ได้มากกว่า glycine เล็กน้อย

จากรูปที่ 10 จะพบว่า การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย HM-IEF โดยมี 1.2% EPPS นั้น การเคลื่อนที่ ของแต่อะไอโซไซม์จะ consistant กว่า การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย VM-IEF การโฟกัสของแต่ละไอโซไซม์ดีกว่า resolution ดี แต่การจำแนกไอโซไซม์ 1+, 1- และ 2+, 2 - ออกจากกันยังไม่ชัดเจน เท่า VM-IEF ซึ่งข้อดีของการจำแนก PGM ด้วย HM-IEF คือ ประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย ไม่ต้องใช้บัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโทรดและไม่ต้องมีระบบควบคุมอุณหภูมิหรือให้ความเย็น แต่ข้อเสียคือ ไม่สามารถขยายช่วงกว้างระหว่างอิเล็กโทรดให้กว้างกว่านี้ได้แม้จะใช้ spacer แล้วก็ตามทำให้ไม่สามารถจำแนกไอโซไซม์ 1+, 1- และ 2+, 2- ออกจากกันได้

เนื่องจากการจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย HM-IEF มีปัญหาเกี่ยวกับระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบที่แคบเกินไป จึงเพิ่มระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบ โดยการเปลี่ยนไปใช้ chamber ขนาดใหญ่ คือ H-IEF ขนาด 15 x 20 x 0.01 ซม. (ข้อ 4.3.3) โดยใช้ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์เท่าเดิม ปริมาณไฟฟ้า 5,000 Volt-hour และใช้ pH ช่วงเดิมคือ 5-7 แต่ช่วงกว้างระหว่างอิเล็กโทรดเพิ่มมากขึ้น เป็น 1.5 ซม. ทำให้สามารถจำแนกไอโซไซม์ของ PGM_1 ออกได้ดี ไอโซไซม์ 1+, 1- และไอโซไซม์ 2+, 2- ถูกแยกออกจากกันเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 11)

จากการทดลองจำแนกรูปแบบของ PGM_1 ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนตัวค้ำจุนชนิดต่าง ๆ และด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงด้วยเครื่องมือและวิธีการทั้งสามแบบดังกล่าวแล้ว สรุปได้ว่าไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 เมื่อ แยกด้วย chamber ขนาดใหญ่ (H-IEF) ที่มีช่วงกว้างระหว่างอิเล็กโทรดเท่ากับ 15 ซม. จะสามารถจำแนกรูปแบบของ PGM_1 ได้ดีที่สุดถึง 10 รูปแบบ คือ 1-, 1+, 1+1-, 1-2-, 1-2+, 1+2-, 1+2+, 2+, 2- และ 2+2- ตามลำดับ จำนวนรูปแบบที่เพิ่มขึ้นจาก 3 รูปแบบในอะกาโรส-สตาร์ชเจลไปเป็น 10 รูปแบบในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลนี้ทำให้อำนาจการจำแนก (discriminating power) (Jone, 1972) ของ PGM เพิ่มขึ้นจาก 0.56 ไปเป็น 0.77 และสูงกว่าเอนไซม์อื่น ๆ เท่าที่มีรายงานด้วย (Bark และคณะ, 1976)

จากการศึกษาของ Divall (Divall, 1981) พบว่าไอโซไซม์ A,B และ C ของ EAP มีค่า pI ต่างกันเล็กน้อย ดังนั้นระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสชิง ซึ่งเป็นระบบที่ใช้จำแนกสารตัวอย่างสองชนิดออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างในค่า pI จึงน่าจะเป็นวิธีการที่จะใช้จำแนกรูปแบบของ EAP ได้ผลดีที่สุดด้วย

การอ่านรูปแบบของ EAP มีความยุ่งยากกว่า PGM นอกจากจะพิจารณาจากตำแหน่งของไอโซไซม์ในเจลแล้วยังต้องพิจารณาถึงความเข้มสัมพัทธ์ของแต่ละแถบไอโซไซม์ด้วย (Divall, 1981) ดังตารางที่ 11 ในภาคผนวกจะเห็นได้ว่า ในกรณีของ EAP ชนิด B, CB และ C จะสามารถเห็นแอคติวิตี้ของสี่แถบไอโซไซม์ใน EAP ชนิด B และ C (b1-b4 และ c1-c4 ตามลำดับ) ในขณะที่ EAP ชนิด CB จะปรากฏให้เห็นผลรวมของแถบไอโซไซม์ b1-b4 และ c1-c4 ในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน (c1+b1), (c1+b2), (c3+b3), (c4+b4) ซึ่ง Budowle (Budowle, 1984) ได้แสดงให้เห็นว่าการแพร่ (diffuse) ของแถบไอโซไซม์นี้ อาจทำให้การอ่านชนิดของเอนไซม์จาก B, C หรือ CB คลาดเคลื่อนไปได้มาก ดังนั้น resolution ของระบบอิเล็กโทรโฟเรซิสจึงมีผลต่อการจำแนกรูปแบบของ EAP มาก

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบระบบ IEF ทั้งสามระบบที่กล่าวแล้วในเบื้องต้นในการจำแนกแถบไอโซไซม์ของ EAP ดังนี้

การจำแนกรูปแบบ EAP ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสชิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยใช้ VM-IEF ขนาด 8 x 10 x 0.075 ซม. ที่ 5.5 %T, 3.0 %C ปริมาณไฟฟ้า 2,000 Volt-hour (500 โวลต์ เวลา 4 ชั่วโมง) เมื่อกำลังไฟฟ้าคงที่ที่ 30 วัตต์ที่ พบว่า ที่ pH 5-7 ไอโซไซม์ A, B และ C ของ EAP สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถอ่านรูปแบบของ EAP ทั้งนี้เนื่องจากมีแถบไอโซไซม์ปรากฏอยู่ ณ ตำแหน่งเดียวกับไอโซไซม์ C ให้เห็นเกือบทุกรูปแบบของ EAP (รูปที่ 12 ช่องที่ 2, 3 และ 4) ส่วนการจำแนกรูปแบบ EAP ที่ pH 4-8 พบว่า ไอโซไซม์ A, B และ C จะปรากฏอยู่ใกล้กันมากกว่าที่ pH 5-7 และยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจนนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากช่วงระหว่าง pHกว้างมากขึ้นในขณะที่ระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบแคบ ทำให้การจัดตัวของ pH อยู่ชิดกันเกินไป

จากรูปที่ 12 จะพบว่าการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ B ซึ่งอยู่ใกล้ขั้วบวกมากที่สุด ที่ไม่ consistant อาจเป็นผลจากระบบ ให้ความเย็นไม่สม่ำเสมอ ทำให้การอ่านรูปแบบของ EAP อาจผิดพลาดได้

การจำแนกรูปแบบของ EAP โดยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยใช้ HM-IEF ขนาด 12.5 x 6.5 x 0.04 ซม.(ข้อ 4.4.2) พบว่าที่ 5.5% T, 4.5% C ปริมาณไฟฟ้า 525 Volt-hour โดยค่อย ๆ เพิ่มศักดาไฟฟ้าเช่นเดียวกับการจำแนกรูปแบบของ PGM จากรูปที่ 14 และ 15 จะพบว่าการจำแนกรูปแบบ EAP ด้วย HM-IEF ที่ pH 6-8 และ pH 5.0-6.5 นั้น การเคลื่อนที่ ของแต่ละไอโซไซม์ที่ได้จะ consistant กว่า การจำแนกรูปแบบ EAP ด้วย VM-IEF แต่ที่ pH 6-8 นั้น สามารถจำแนกไอโซไซม์ของ EAP ออกจากกันได้เพียง 2 ไอโซไซม์เท่านั้น ส่วนไอโซไซม์ A คาดว่ายังไม่สามารถแยกออกจากฮีโมลโกลบินได้ ส่วนที่ pH 5.0-6.5 นั้น ไอโซไซม์ A สามารถแยกออกจากฮีโมลโกลบินได้ และเคลื่อนที่เข้าใกล้ขั้วลบมากกว่าไอโซไซม์ C และ B ตามลำดับ นั่นคือ การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลโดยใช้ HM-IEF ที่ pH 5.0-6.5 สามารถแยกไอโซไซม์ของ EAP ได้ 3 ไอโซไซม์และมีความชัดเจนดี แต่ข้อเสียของการจำแนก EAP ด้วย HM-IEF นี้คือใน EAP ที่เป็น heterozygote เช่น BA นั้นพบว่า ความเข้มของไอโซไซม์ A จะน้อยมากอาจทำให้การอ่านรูปแบบคลาดเคลื่อนไปส่วน H-IEF ขนาด 15 x 20 x 0.01 ซม. (ข้อ 4.4.3) โดยใช้ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์เท่าเดิม ปริมาณไฟฟ้า 2,000 Volt-hour pH 4-8 สามารถจำแนกไอโซไซม์ทั้งสามคือ A, B และ C ของ EAP ออกจากกันได้อย่างชัดเจนดังรูปที่ 16 ทำให้สามารถอ่านรูปแบบของ EAP ได้ถึง 6 รูปแบบ คือ A, B, C, BA, CA และ CB ตามลำดับ

จากการทดลองจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงด้วยเครื่องมือและวิธีการทั้งสามแบบดังกล่าวแล้วสรุปได้ว่าไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 เมื่อแยก ด้วย H-IEF ที่มีช่วงกว้างระหว่างอิเล็กโทรด 15 ซม. จะสามารถจำแนกรูปแบบของ EAP ได้ดีที่สุดถึง 6 รูปแบบ และ resolution ดี

Simultaneous typing เป็นแนวความคิดในการจำแนกรูปแบบของเอนไซม์ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปโดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสเพียงครั้งเดียว (Wraxall & Stolorow, 1986) ซึ่งมีข้อดี-ข้อเสียหลายอย่าง ข้อดีคือ ประหยัดเวลา, ปริมาณเลือดตัวอย่างและค่าใช้จ่าย แต่มีข้อเสียคือ เนื่องจากสภาวะที่ใช้อาจไม่ดีที่สุดสำหรับเอนไซม์ทุกชนิดที่กำลังศึกษา ดังนั้นอาจทำให้ resolution ไม่ดี ไม่สามารถจำแนก rare variants ของแต่ละเอนไซม์ได้

ในการทดลองนี้อาจทำได้ 2 แบบ คือ Simultaneous typing ของ PGM และ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยใช้ VM-IEF ที่สภาวะเงื่อนไขเดียวกับรูปที่ 7 และ 12 ทำการทดลองจำแนกเลือดตัวอย่างชุดเดียวกันพร้อมกัน 2 เจล เมื่อสิ้นสุดการแยก นำเจลแผ่นหนึ่งไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM อีกเจลหนึ่งไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ EAP พบว่าสามารถจำแนกรูปแบบของ PGM โดยการแยกไอโซไซม์ 1+, 1-, 2+ และ 2- ออกจากกันได้ ส่วน EAP ก็สามารถจำแนกรูปแบบของไอโซไซม์ A, B และ C ออกจากกันได้เช่นเดียวกับการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงของแต่ละเอนไซม์ ดังรูปที่ 7 และรูปที่ 12 ตามลำดับ จะเห็นว่าการทำ simultaneous typing ในกรณีนี้เป็นการประหยัดเวลาในการ run เท่านั้น แต่ปริมาณสารเคมีที่ใช้ และเลือดตัวอย่างยังคงเท่าเดิม อย่างไรก็ตาม การทำ IEF ด้วย VM-IEF นี้ยังให้ resolution ต่ำสำหรับเอนไซม์ทั้งสอง ดังกล่าวแล้วข้างต้น

การทำ simultaneous typing อีกวิธีหนึ่งเป็น ของ EAP และ EsD ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยใช้ H-IEF ขนาด 15 x 20 x 0.01 ซม. ที่ 5.5% T, 4.5% C และมีสภาวะเงื่อนไขดังอธิบายในข้อ 3.11.2 โดยในเจลนี้ใส่ 3.14% N-[2-Hydroxyethyl] piperazine N-[2-ethanesulfonic acid (HEPES) มีค่า pK 7.5 ที่ 25^{o}C เป็น spacer HEPES จะไปทำหน้าที่เช่นเดียวกับ 3-(N-morpholins) propanesulfonic acid (MOPS) ซึ่งมีค่า pK=7.2 ที่ 25^{o}C คือจะไปขยาย pH ให้กว้างขึ้น เพื่อให้ไอโซไซม์ของ EsD จัดเรียงตัวดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วย maintain ไอโซไซม์ A ของ EAP ด้วย (Stella และคณะ, 1985) พบว่าไอโซไซม์ของ EAP และ EsD สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน

รูปที่ 17 แสดงว่าใน การทำ simultaneous typing ของ EAP และ EsD ด้วย H-IEF ที่ pH 4-8 โดยมี 3.14% HEPES นั้น การเคลื่อนที่ของแต่ละไอโซไซม์ของ EAP และ EsD นั้นจะ consistant สามารถแยกไอโซไซม์ A, B และ C ของ EAP และแยกไอโซไซม์ 1, 2 ของ EsD ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยไอโซไซม์ของ EAP จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ (pH 8) และไอโซไซม์ของ EsD จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก (pH 4) แถบของแต่ละไอโซไซม์จะมีความเข้ม และคมชัดให้ resolution ที่ดี โดยไอโซไซม์ A ของ EAP จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบเร็วที่สุด รองมาคือไอโซไซม์ C และ B ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซไซม์ของ EsD1 ประกอบด้วยแถบไอโซไซม์ที่มีความเข้มมากอยู่ทางด้านขั้บลบแถบหนึ่ง (a heany cathodic band) ส่วนอีกแถบหนึ่งมีความเข้มน้อยกว่าปรากฏทางด้านขั้วบวก (a lighter anodic band) (ช่องที่ 1, 2, 4, 14, 17, 19, 21, 23, 27 ของรูปที่ 17) ส่วนไอโซไซม์ของ EsD 2 ประกอบด้วยไอโซไซม์แถบคู่ 2 แบบ อยู่ระหว่างไอโซไซม์ทั้งสองของ EsD 1 (ช่องที่ 7, 16, 20 ของรูปที่ 17) ใน EsD 2.1 จะพบ สี่แถบไอโซไซม์ (จาก EsD 1 สองแถบไอโซไซม์และ EsD 2 สองแถบไอโซไซม์ ส่วน EsD 5.1 และ EsD 5.2 จะปรากฏแถบไอโซไซม์เพิ่มขึ้นอีกสองแถบ ทางด้านขั้วบวกของ EsD 1 และ EsD 2 ตามลำดับ บางครั้งจะพบแถบ EsD 2 มารวมกันเป็นแถบไอโซไซม์เดียว ดังการทดลองของ Divall (Divall, 1983)

ดังนั้นจะเห็นว่า จากการทำ Simultaneous typing ของ EAP และ EsD โดย H-IEF บนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 และมี 3.14% HEPES เป็น spacer สามารถจำแนกรูปแบบของ EAP และ EsD ซึ่งเป็นโพลีมอร์ฟิกเอนไซม์ที่สำคัญทางนิติเวชศาสตร์ได้ถึง 6 และ 5 รูปแบบตามลำดับ คือ EAP ชนิด A, B, C, BA, CA และ CB ส่วนรูปแบบของ EsD คือ EsD 1, EsD 2, EsD 2.1, EsD 5.1 และ EsD 5.2 จากผลการทดลองในครั้งนี้ ทำให้ได้รูปแบบของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในเวลาเดียวกันจึงประหยัดเวลา เลือดตัวอย่าง ตลอดจนค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มอำนาจในการจำแนก (discriminating power) ให้สูงกว่าระบบที่สามารถจำแนกแต่ละเอนไซม์ในการทำแต่ละครั้ง

นั่นคือ การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงโดยใช้เครื่องมือทั้งสามชนิดคือ VM-IEF, HM-IEF และ H-IEF นั้น H-IEF เป็นเครื่องมือที่ใช้จำแนกรูปแบบของเอนไซม์ทั้งสามให้ resolution

ดีที่สุด แต่เนื่องจากเครื่องมือชนิดนี้มีราคาแพง ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กจึงอาจเลี่ยงไปใช้ HM-IEF แทนได้ ถึงแม้ resolution ไม่ดีนักแต่ก็สามารถจำแนกแต่ละเอนไซม์ได้

ในแง่ความเสถียรของเอนไซม์ทั้งสาม พบว่า ในสภาพแวดล้อมของบ้านเราสามารถจำแนกรูปแบบของ PGM_1 ได้ เมื่อคราบเลือดมีอายุถึง 105 วัน ก็ยังสามารถจำแนกชนิดของ PGM_1 ได้ แต่ความเข้มของไอโซไซม์ก็เลือนลางลง ส่วนความเข้มของแถบไอโซไซม์ของ EAP และลดลง แต่ยังสามารถอ่านรูปแบบของ EAP ได้ถึงประมาณวันที่ 21 ความเข้มของแถมไอโซไซม์ของ EsD จะลดลงเร็วกว่าของ EAP โดยจะยังสามารถอ่านรูปแบบของ EsD ได้ถึงประมาณวันที่ 12 เท่านั้น

เคยมีรายงานทางสหราชอาณาจักรรายงานด้านเสถียรภาพของเอนไซม์ในสภาพแวดล้อมดังกล่าว โดย Budowle และคณะ (1986) ว่าคราบเลือดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะสามารถเห็นแอคติวิตี้ของ PGM_1 เมื่อเวลาผ่านไปถึง 4 เดือน หลังจากนั้นรูปแบบของไอโซไซม์ของ PGM_1 จะค่อย ๆ เลือนลางยากที่จะอ่านรูปแบบได้ นอกจากนี้ Budowle และคณะ ยังได้ทำการศึกษาความเสถียรของ PGM_1 ในคราบอสุจิ พบว่า ความเสถียรของ PGM_1 ในคราบอสุจิจะน้อยกว่าในคราบเลือด คือ หลังจากเก็บคราบอสุจิไว้ 1 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์ พบว่า 27.7% และ 66% ตามลำดับ ไม่สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM_1 ได้ และหลังจาก 3 สัปดาห์แล้วจะไม่สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM_1 ได้เลย ทั้งนี้คาดว่าแอคติวิตี้ของ PGM_1 ในอสุจิมีความเสถียรน้อยกว่าในเลือดเนื่องจาก ในอสุจิจะมี proteolytic activity สูง (Edwards และคณะ, 1981) จะเห็นได้ว่า สภาวะแวดล้อมของบ้านเราทำให้ PGM มีความเสถียรต่ำลงมาก

จากรูปที่ 20 และ 21 เป็นการศึกษารูปแบบของ PGM และ EAP ในแง่ของการตรวจพิสูจน์ พ่อ-แม่-ลูก (Paternity testing) พบว่า PGM และ EAP สามารถถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นไปตามกฎของเมนเดล ดังนั้น จึงใช้คุณสมบัติข้อนี้ในการตรวจยืนยันหรือปฏิเสธพ่อ-แม่-ลูก ได้

ในการศึกษารูปแบบการกระจายของเอนไซม์ต่าง ๆ ในประชากรนั้น จะใช้ค่า "chi-squared" (X^2) ซึ่งเป็นค่าทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบดูความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทดลอง (observed) กับค่าทางทฤษฎี (theoretically หรือ expected)

ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ (Pasteur, N & Pasteur G., 1988) และศึกษาถึงรูปแบบการกระจายของเอนไซม์หนึ่ง ๆ ในประชากรว่าเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg Law หรือไม่ (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ง) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การกระจายของ PGM และ EsD ในประชากรไทยนั้นไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg Law ดังในตารางที่ 2 และ 4 ตามลำดับ คือ พบว่า PGM และ EsD มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าความถี่ที่ได้จากการสังเกตุ (observed frequency) กับค่าความถี่ทางทฤษฎี (expected frequency) โดยค่า x^2 ของ PGM และ EsD เท่ากับ 27.7024 และ 41.6644 ตามลำดับ (ค่า x^2 ที่จะยอมรับว่าเป็นไปตาม Hardy-Weinberg Law คือ ค่า x^2 ที่คำนวณได้แล้วนำไปอ่านค่า p (probability) จาก Diagram of X^2 ดังรูปที่ 30 ในภาคผนวก ง ถ้าค่า p ที่ได้น้อยกว่า 0.05 สมมติฐานนั้นก็ยอมรับ) ในงานทดลองนี้ค่าที่ยอมรับได้ถือผลจาก EAP ซึ่งหมายความว่า การกระจายของ EAP ในประชากรไทย เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg แต่ผลของ PGM และ EsD นั้น ความเบี่ยงเบนของสถิติสูงมาก อาจเนื่องมาจากสาเหตุประการหนึ่งต่อไปนี้

Hardy-Weinberg Law กล่าวว่า ความเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากมีการแต่งงานแบบคัดเลือก (non-random mating) การอพยพโยกย้ายถิ่นที่อยู่ของคน และนำเอายีนบางชนิดไปสู่ท้องถิ่นใหม่ (migration), ธรรมชาติจะเป็นผู้คัดเลือกโดยผู้ที่ไม่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในขณะนั้นย่อมถูกขจัดไป และสูญพันธุ์ไปในที่สุด (selection) ประการสุดท้ายคือ การเปลี่ยนแปลงของ genetic material ชนิดถาวรและถ่ายทอดไปให้ลูกหลานได้ (mutation) อย่างไรก็ตามการจะสรุปว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นสาเหตุของความเบี่ยงเบนของ PGM และ EsD ในประชากรไทยจริงจากการทดลองเพียง 250 ตัวอย่าง อาจเป็นการเสี่ยงเกินไป เพื่อจะทำให้ผลการทดลองนี้ยอมรับได้ควรทำการทดลองเพิ่มตัวอย่างขึ้นไปอีกจนกว่าจะได้ค่าทางสถิติที่ยอมรับ เหตุผลประการที่สองได้จากข้อสังเกตุที่ว่าในผลการทดลองนี้ในรายงานของประชากรไทยนี้พบว่าค่า x^2 ของ PGM ที่ทำให้ Σx^2 ของ PGM สูงมากคือ ค่า x^2 ของ $PGM_1 1-$, $PGM_1 1+2+$, $PGM_1 2-$ และ $PGM_1 1-2+$ (ตารางที่ 2) โดยจะพบว่า $PGM_1 1+1-$ จะมีค่าที่ได้จากการสังเกตุ (30) ต่ำกว่าค่าที่ได้จากทฤษฎี (37.55) ในขณะที่ $PGM_1 1-$ จะมีค่าที่ได้จาก

การสังเกตุ (10) สูงกว่าค่าที่ได้จากทฤษฎี (3.97) ความเบี่ยงเบนที่เกิดอาจเนื่องมาจากผลจริงในหมู่ประชากรหรืออาจเป็นไปได้ว่า เทคนิคการศึกษาจำแนกรูปแบบเอนไซม์ยังไม่แม่นยำพออาจจะมีการอ่านรูปแบบผิดไปจากความจริงคือ อ่านรูปแบบของ PGM_1 1+1- เป็น PGM_1 1- ในทำนองเดียวกัน PGM_1 1+2+ และ PGM_1 1+2- ซึ่งหากพิจารณาจากตำแหน่งของไอโซไซม์จะพบว่า 1+, 1- และ 2+,2- แยกจากกันน้อยมาก โอกาสที่จะอ่านผิดเป็นไปได้สูง EsD ก็เป็นไปในทำนองเดียวกันระหว่าง EsD 2 และ EsD 2.1 ที่อาจจะอ่านรูปแบบผิดไประหว่างรูปแบบทั้งสอง สาเหตุที่ทำให้การอ่านรูปแบบของ EsD ผิดไป อาจเป็นผลมาจากวิธีที่ใช้ในการจำแนกรูปแบบของ EsD ยังไม่ดีพอ หรือความชำนาญของผู้อ่านรูปแบบที่มีประสพการณ์ต่ำ อันนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ค่าการกระจายของ PGM และ EsD ในประชากรไทยเบี่ยงเบนไปจากกฎของ Hardy-Weinberg Law อย่างไรก็ตาม การกระจายของ EAP ในประชากรไทยเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg Law ($\pm x^2$=0.0442) คือไม่มีความแตกต่างกันระหว่างค่าที่ได้จากการสังเกตุกับค่าที่ได้จากทฤษฎี

อย่างไรก็ตามผลการทดลองอันนี้ชี้ให้เห็นความเสี่ยงที่จะใช้ PGM_1 1-, PGM_1 1+2+, PGM_1 2- และ PGM_1 1-2+ และ EsD 2 และ EsD 2.1 ในงานด้านนิติเวช วิธีหลีกเลี่ยงความเสี่ยงอันนี้คือ ใช้ H-IEF ในการจำแนกรูปแบบ PGM และ จำแนกรูปแบบ EsD โดยการทำเฉพาะ EsD เพียงเอนไซม์เดียวในการทำแต่ละครั้ง

จากตารางที่ 5, 6 และ 7 ซึ่งเปรียบเทียบ gene frequency ของ PGM, EAP และ EsD ของประชากรในประเทศต่าง ๆ ตามลำดับ พบว่า gene frequency ของ $PGM_1{}^{1+}$ จะสูงที่สุดในขณะที่ gene frequency ของ $PGM_1{}^{2-}$ จะต่ำที่สุด, gene frequency ของ P^B จะสูงกว่า P^A ในขณะที่ gene frequency ของ P^C จะพบได้น้อยมาก ส่วน EsD นั้น พบว่า gene grequency ของ EsD^1 จะสูงกว่าของ EsD^2 และ gene frequency ของ EsD^5 จะพบได้น้อยในขณะที่ gene frequency ของ EsD^7 พบได้น้อยมากซึ่งในการศึกษาการกระจายของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทยในครั้งนี้ ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน

จากการศึกษาการกระจายของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุศาสตร์แล้วสามารถยังนำไปคำนวณหาอำนาจในการจำแนก (discriminating

power) ของเอนไซม์เหล่านี้เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาว่าเอนไซม์ชนิดใดมีศักยภาพสูงในการเป็นตัวบ่งชี้ในงานนิติเวชศาสตร์สำหรับประเทศไทย

อำนาจการจำแนก (Discriminating power หรือ discriminating probability, DP) เป็นความสามารถที่ใช้จำแนกสารตัวอย่างสองชนิดออกจากกัน (Jones, 1972) ดังสมการ

$$DP = 1 - \sum_{i=1}^{n} Pi^2$$

เมื่อ DP = อำนาจในการจำแนก (Discriminating power)

n = จำนวน phenotype ของเอนไซม์หนึ่ง ๆ

Pi = ความถี่ของการตรวจพบแต่ละ phenotype ของเอนไซม์นั้นในประชากรหนึ่ง

จากสมการข้างต้นจะเห็นว่าปัจจัยที่มีผลต่อ DP คือ จำนวน phenotype(n) ของเอนไซม์หนึ่ง ๆ และความถี่ของการตรวจพบแต่ละ phenotypes (phenotypic frequency, Pi) ในประชากรหนึ่ง ๆ ทั้งนี้จำนวน phenotype(n) ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และความสามารถของระบบอิเล็กโทรโฟริซิสอีกด้วย

จากการศึกษา discriminating power (DP) ของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทยพบว่า มีค่าเท่ากับ 0.79, 0.57 และ 0.59 ตามลำดับ ซึ่งค่า DP ที่คำนวณได้จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าค่า DP ของ PGM มีค่าสูงที่สุด รองมาคือ ค่า DP ของ EsD และ EAP ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจาก PGM สามารถให้จำนวน phenotype ได้มากกว่า EsD และ EAP จากการทดลองของ Budowle และคณะ (1985) พบว่าค่า DP ของ PGM จะสูงที่สุดเช่นกัน แต่ค่า DP ของ EAP จะสูงกว่าค่า DP ของ EsD ซึ่งต่างกับการทดลองในครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองของ Budowle และคณะ สามารถพบ EAP รูปแบบ CA, CB, และรูปแบบ RB และ EB ที่พบได้ยาก (RARE TYPE) ด้วย ในขณะที่ในประชากรไทยไม่สามารถตรวจพบ

allele P^C และ rare type ของ EAP ได้ (พบเพียง 3 รูปแบบคือ A, B และ BA)

ดังนั้นจะเห็นได้จากค่า DP รวมของ PGM, EAP และ EsD ในการทดลองครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 0.96 ซึ่งมีค่าสูงกว่า ค่า DP ของ PGM, EAP และ EsD ซึ่งหมายความว่าในจำนวนประชากร 100 คน โอกาสที่จะพบรูปแบบของเอนไซม์ทั้งสามซ้ำซ้อนกันมีเพียง 4 คน ดังนั้นในการจำแนกเลือดตัวอย่างสองชนิดออกจากกัน ถ้าสามารถใช้จำนวนชนิดของเอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ได้หลายเอนไซม์พร้อมกันแล้ว จะทำให้อำนาจการจำแนกมีประสิทธิภาพดีกว่าใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว

สรุปได้ว่า ประโยชน์ของค่า DP คือ ใช้เป็นตัวกำหนดว่าควรจะใช้เอนไซม์ใดเป็นเป็นอันดับแรกเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ในงานทางนิติเวชศาสตร์ ในกรณีที่วัตถุพยานมีจำนวนน้อยมาก ๆ ในกรณีนี้เอนไซม์ที่มีค่า DP สูงที่สุด ควรได้รับการพิจารณาเป็นอันดับแรก

สรุปผลการทดลอง

1. วิธีการทางอิเล็กโทรโฟริซิสที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ PGM, EAP และ EsD คือ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลิอะคริลาไมด์เจล โดยใช้ H-IEF ที่ pH 5–7 สำหรับ PGM และ pH 4–8 สำหรับ EAP และ EsD ด้วยวิธีการและเครื่องมือชนิดนี้ ให้ resolution สูงที่สุด และสามารถทำ Simultaneous typing ได้ จึงเป็นการประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และปริมาณเลือดตัวอย่าง

2. ในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย PGM เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรสูงที่สุด โดย PGM ยังสามารถจำแนกรูปแบบได้แม้คราบเลือดมีอายุถึง 105 วัน

3. รูปแบบการกระจายของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทยพบว่า genes frequency ของ PGM, EAP และ EsD เป็นดังนี้

PGM_1 : PGM_1^{1+} (0.596), PGM_1^{1-} (0.126), PGM_1^{2+} (0.162), PGM_1^{2-} (0.116)

EAP : P^A(0.292), P^B(0.708)

EsD : EsD^1(0.688), EsD^2(0.306), EsD^5(0.006)

4. อำนาจในการจำแนก (discriminating power, DP) ของ PGM, EAP และ EsD มีค่า 0.79, 0.57 และ 0.59 ตามลำดับ ดังนั้น PGM จึงเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในงานนิติเวชสูงมาก และอำนาจในการจำแนกรวมของ PGM, EAP และ EsD เพิ่มขึ้นเป็น 0.96 นั่นคือ การใช้เอนไซม์ทั้งสามนี้ร่วมกันเป็นตัวบ่งชี้ จะทำให้การตรวจพิสูจน์บุคคลจากโลหิตมีความเชื่อมั่นสูงขึ้นมาก