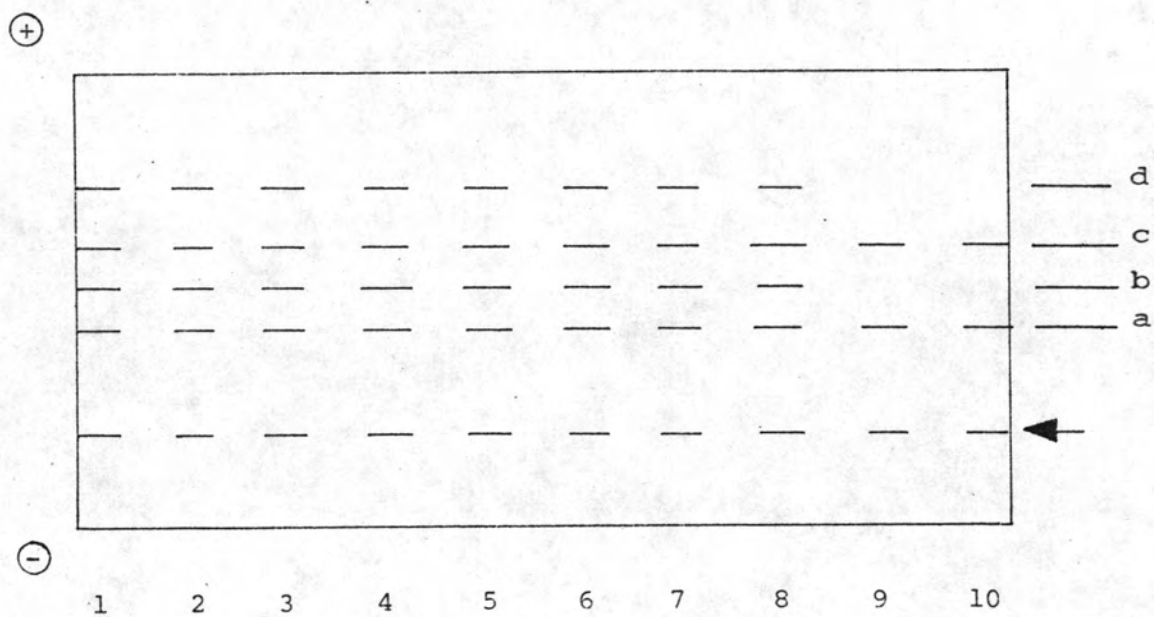


ผลการทดลอง

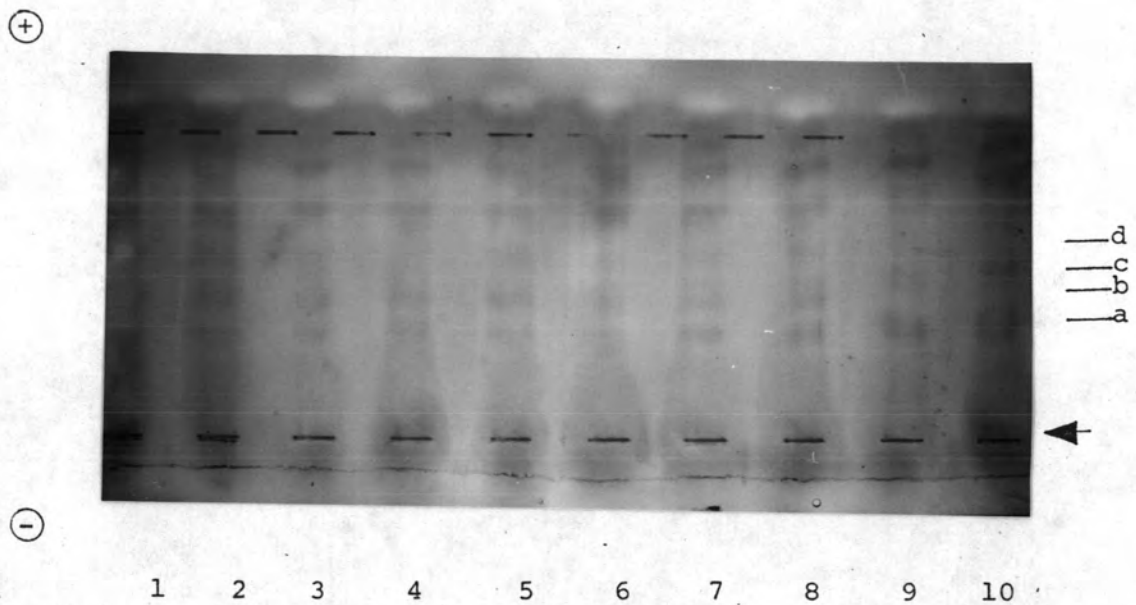
4.1 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโพรซิสนอะกาโรสและสตาร์ชเจล

ในขั้นต้นของการทดลองได้ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2% เป็นตัวค้ำจุน โดยทำอิเล็กโทรโพรซิสที่ pH 7.4 ซึ่งเป็น pH เดียวกับที่มีผู้ใช้ในการจำแนก PGM ด้วยเซลลูโลสอะซิเตต พบว่าไม่สามารถจำแนกไอโซไซม์ออกจากกันได้ แถบสีที่ได้จากการติดตามแอคติวิตี้ของ PGM มีลักษณะจางและแพร่กระจายกว้างมาก นอกจากนี้ในขณะที่ทำอิเล็กโทรโพรซิสลักษณะของอะกาโรสทางซ้ายบวมก่้างมาก เนื่องจากอะกาโรสมีความสามารถในการเกิดอิเล็กโทรเอนโดสมิซิส (electroendosmosis, EEO) ถึงแม้จะเลือกใช้อะกาโรสที่มีค่า EEO ต่ำสุด จนถึงน้อยกว่า 0.10 แล้วก็ตาม

จากผลดังกล่าวจึงเปลี่ยนไปใช้สารผสมระหว่างอะกาโรสและสตาร์ชในปริมาณอย่างละ 1% เป็นตัวค้ำจุนโดยมีขนาด 12.5 x 26 x 0.1 ซม. ทำอิเล็กโทรโพรซิสที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 250 โวลต์, กระแสไฟฟ้า 89 มิลลิแอมป์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที พบว่าได้ผลดีขึ้นกว่าในอะกาโรสอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 1 คือ เกิดการแยกของไอโซไซม์ใน PGM เป็น 4 แถบ (a,b,c,d) ทำให้จำแนก PGM ได้ 3 รูปแบบ (PGM₁1, PGM₁2, PGM₁2-1) โดยที่ PGM₁1 จะพบแถบไอโซไซม์ a และ c ส่วน PGM₁2 จะพบแถบไอโซไซม์ b และ d ในขณะที่ PGM₁2-1 จะพบแถบไอโซไซม์ a,b,c และ d โดยที่แถบไอโซไซม์ d จะเคลื่อนที่ไปยังซ้ายบวมได้เร็วที่สุดแต่แถบสีที่ได้ยังมีลักษณะกว้างไม่คมชัด จนเกิดการเกยทับ (Overlapping) ของแถบไอโซไซม์ได้



รูปที่ 4ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูปที่ 4ข



รูปที่ 4ข การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสและสตาร์ช
ความเข้มข้นอย่างละ 1% ที่ pH 7.4

ใช้ 0.1 M Tris-maleic, pH 7.4 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับบรรจุในถ່องทำอิเล็กโทรโฟรีซิส และใช้บัฟเฟอร์เดียวกันที่เจือจาง 15 เท่าสำหรับควบคุม pH ในเจล แผ่นเจลมีขนาด 12.5 x 26 x 0.1 ซม. คัดตาไฟฟ้าคงที่ที่ 250 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 89 มิลลิแอมป์ที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง และห่างจากขั้วลบ 2.5 ซม.

ช่องที่ 1,2 PGM มาตรฐานชนิด 2-1

ช่องที่ 3,4,5,6,7,8 PGM ชนิด 2-1

ช่องที่ 9,10 PGM ชนิดที่ 1-1

4.2 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล

โพลีอะครีลาไมด์อาจเป็นตัวกลางที่ดีกว่าอะกาโรส และสตาร์ช เพราะสามารถทำให้เกิด sieving effect ได้ ซึ่งป้องกันการแพร่กระจายของโมเลกุลของไอโซไซม์ อันจะทำให้แถบสีที่ได้มีความคมชัดขึ้น ไม่เกิดการเกยทับของไอโซไซม์ ในการทดลองขั้นต่อไป จึงใช้โพลีอะครีลาไมด์เจลเป็นตัวค้ำจุน

4.2.1 การจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล

ประเภทต่อเนื่อง (Continuous gel electrophoresis ที่ pH 7.4)

ได้ทดลองทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้โพลีอะครีลาไมด์ที่มี % T เท่ากับ 7.5 ทดลองแปรความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เดิมที่ใช้ได้ผลในระบบอะกาโรสและสตาร์ชเจลที่ pH 7.4 รักษาปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบในแต่ละครั้งของการทดลองให้คงที่ที่ 40 มิลลิแอมป์ ทั้งนี้เพื่อควบคุมอุณหภูมิของระบบไม่ให้สูงมากเกินไป สังเกตการเคลื่อนที่ของโปรตีนในขณะที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยฮีโมโกลบินในสารตัวอย่าง และติดตามอำนาจในการจำแนก PGM ของระบบด้วยการย้อมสีโปรตีนและย้อมแอดคิวิตี้ของ PGM (ข้อ 3.4) ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส

บนโพลีอะครีลาไมด์เจลแบบต่อเนื่องที่ pH 7.4

ความเข้มข้นของโพลีอะครีลาไมด์ 7.5% T ขนาดเจล 8 x 10 x 0.075 ซม.

แปรความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ดังระบุในตาราง pre-run เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 40 มิลลิแอมป์ หลัง pre-run เปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับขณะ pre-run ให้กระแสคงที่ที่ 40 มิลลิแอมป์ รอคุนีโมโกลบินเคลื่อนที่ไปจนตกเจลด้านซ้ายวอก จึงหยุดการท้ออิเล็กโทรโฟรีซิส

สภาวะ ที่	ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์		ความต่างศักย์(โวลต์)		เวลา (นาที)	ผลการทดลอง
	อิเล็กโทรด	ในเจล	เริ่มต้น	สิ้นสุด		
1	X	X/10	15	15	135	โปรตีนและ PGM ไม่เคลื่อนที่
2	X/2	X/2	26	30	180	โปรตีนและ PGM ไม่เคลื่อนที่
3	X/4	X/4	56	53	120	โปรตีนและ PGM เคลื่อนที่ไป 1 ใน 3 ของระยะทาง ทั้งหมดแต่ resolution ต่ำมาก
4	X/10	X/10	100	107	180	PGM เคลื่อนที่ไป 1 ใน 5 ของระยะทางทั้งหมดและ resolution ต่ำมาก เมื่อสิ้นสุดการท้ออิเล็กโทร- โฟรีซิส pH ของบัฟเฟอร์ เปลี่ยนจาก 7.4 เป็น 10.1

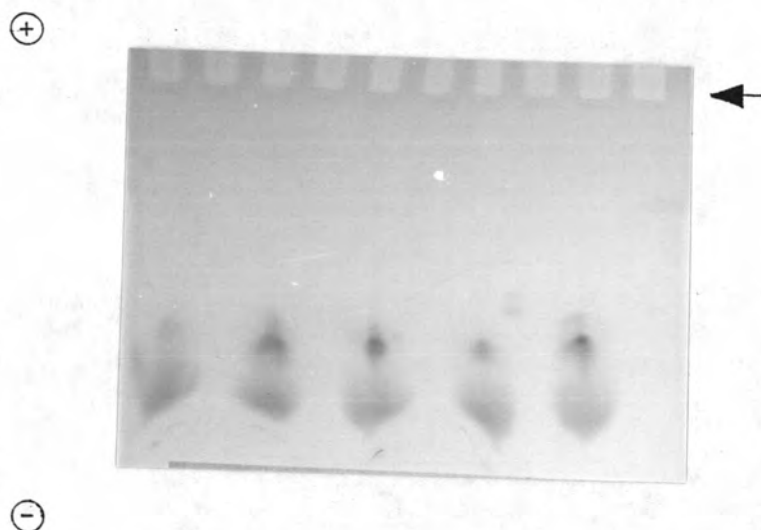
X คือ 0.2 M Tris-maleic 0.02 M EDTA, 0.02 M MgCl₂, pH 7.4

ผลจากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่ 1 ซึ่งใกล้เคียงกับที่ใช้ในระบบ อะกาโรส-สตาร์ชเจลที่สูงสุด โบรดีนและ PGM ไม่เคลื่อนที่เลยเหมือนกับในสภาวะที่ 2 ซึ่งลดความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในอิเล็กโทรดลง 1 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่า คักดาไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในสองสภาวะนี้ต่ำมาก (15,26 โวลต์) อาจต่ำเกินไปที่จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโบรดีนและ PGM ได้ ทั้งนี้อธิบายได้ว่า เพราะระบบโพลีอะคริลาไมด์มีความต้านทานสูงกว่าในระบบของอะกาโรสสตาร์ชมาก การทดลองในสภาวะต่อไปจึงเพิ่มคักดาไฟฟ้าให้แก่ระบบโดยลดความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ลงตามลำดับ พบว่าสภาวะที่ 3 เมื่อเจือจางบัฟเฟอร์เดิมลง 4 เท่า สามารถทำให้โบรดีน และ PGM เคลื่อนที่ไปได้ 1 ใน 3 ของระยะทางทั้งหมดตามลำดับ แต่ยังเป็นระยะทางที่สั้นเกินกว่าจะจำแนกไอโซไซม์ของ PGM ออกจากกันได้

สภาวะที่ 4 ให้ค่าคักดาไฟฟ้า เป็นที่น่าพอใจที่สุด (100 โวลต์) PGM เคลื่อนไปในระยะทาง 1 ใน 5 ของระยะทางทั้งหมด แต่เกิดปัญหาที่ทำให้ไม่สามารถพัฒนาระบบได้ต่อไป คือ บัฟเฟอร์ไม่สามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่างได้ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง pH ของบัฟเฟอร์ในสารละลายอิเล็กโทรดเปลี่ยนไปถึง 2.7 หน่วย (ไปเป็น pH 10.1)

4.2.2 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบไม่ต่อเนื่อง (Discontinuous gel electrophoresis) ที่ pH 8.9

ได้ทำการทดลองจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบไม่ต่อเนื่องที่ pH 8.9 และแปรความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ (7.5% T, 10% T และ gradient concentration 5-15%T, 5-12%T และ 7-12%T ตามลำดับ) จากรูปที่ 5 ซึ่งเป็นผลของการแยก PGM โดยใช้ 10%T ซึ่งให้ resolution สูงที่สุดจากการแปรความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ทั้งหมดพบว่า PGM สามารถแยกออกจากกันได้บ้างแต่ยังไม่ชัดเจน และ resolution ยิ่งต่ำกว่าผลจากอะกาโรสสตาร์ชเจล



รูปที่ 5 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล แบบไม่ต่อเนื่อง (Discontinuous polyacrylamide gel) ที่ pH 8.9 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midget electrophoresis) ใช้ 0.05 M Tris-glycine, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับบรรจุในกล่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิส และ 0.30 M Tris-chloride, pH 8.9 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับเจล (gel buffer) ขนาดเจล 8 x 10 x 0.075 ซม. ความเข้มข้นของ stacking gel 4.5% T, 3% C และ ของ separating gel 10%T, 3%C กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 40 มิลลิแอมป์, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (←) แสดงตำแหน่งที่ apply ตัวอย่าง

4.3 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

4.3.1 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midget electrophoresis)

จากผลการทดลองในข้อ 4.1 และ 4.2 พบว่าการจำแนกรูปแบบ PGM โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนตัวค้ำจุนที่มี pH คงที่ ยังไม่สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM ให้ได้ resolution ที่ดี จึงได้ทำการทดลองจำแนกรูปแบบของ PGM โดยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง โดยเริ่มจากการศึกษาถึงสภาวะต่าง ๆ ที่มีผลต่อการจำแนก PGM คือ

1. ความเข้มข้นของเจล

ได้ทำการแปรความเข้มข้นของเจลระหว่าง %T เท่ากับ 5.5, 6.0 และ 7.0 ตามลำดับพบว่า resolution ที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ในทางปฏิบัติ 5.5%T ให้เจลที่อ่อนนุ่มเกินไป ยากต่อการนำมาตรวจวัดแอดคทีวิตี

2. Volt-hour เนื่องจากในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง คัดดาไฟฟ้า และเวลาในการแยก มีผลต่อ resolution ของโปรตีนจึงทำการแปรคัดดาไฟฟ้าที่ 400 โวลต์ และ 500 โวลต์ และแปรเวลาที่ใช้ในการแยก จาก 3,4 และ 5 ชม. ตามลำดับ โดยแต่ละครั้งให้กำลังไฟคงที่ที่ 30 วัตต์ พบว่าความต่างศักย์และเวลาที่ใช้ในการแยก ที่ทำให้ resolution ของ PGM ดีที่สุด คือ คัดดาไฟฟ้าคงที่ที่ 500 โวลต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (2,000 volt-hour) ที่กำลังไฟคงที่ที่ 30 วัตต์ ดังรูปที่ 7

3. ผลของเกลือ จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่ม Volt-hour ถึง 2,000 volt-hour แล้วยังพบว่า แถบสี PGM ที่ได้ ยังมีลักษณะเป็นคลื่น (รูปที่ 6) คลื่นนี้ทำให้ตำแหน่งของไอโซไซม์คลาดเคลื่อนจากรูปแบบของ PGM ไม่ได้ ลักษณะเช่นนี้เกิดจากปัจจัยอื่นที่นอกเหนือจากการโฟกัสที่ไม่สมบูรณ์ และปัจจัยนี้อาจอยู่ในระบบอิเล็กโทรโฟกัสซิง และไม่ควรรออยู่ในเลือดตัวอย่าง เนื่องจากการเตรียมเลือดตัวอย่างใช้วิธีเดียวกับในการทดลองเรื่องอะกาโรสสตาร์ช (ข้อ 4.1) ซึ่งได้แถบสีเป็นเส้นตรง ลักษณะของแถบคลื่นที่มองเห็นอาจเป็นผลเนื่องจากตัวระบบถูกรบกวนด้วยเกลือแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตที่ใช้ในการโพลีเมอร์ไรซ์เจล

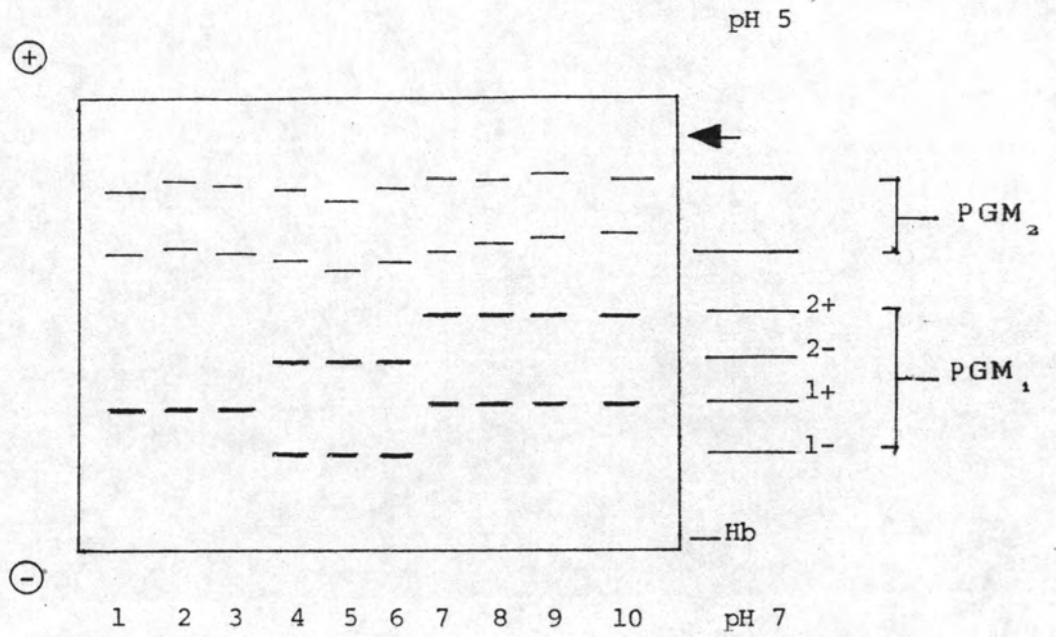


รูปที่ 6 ผลของแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตต่อระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล

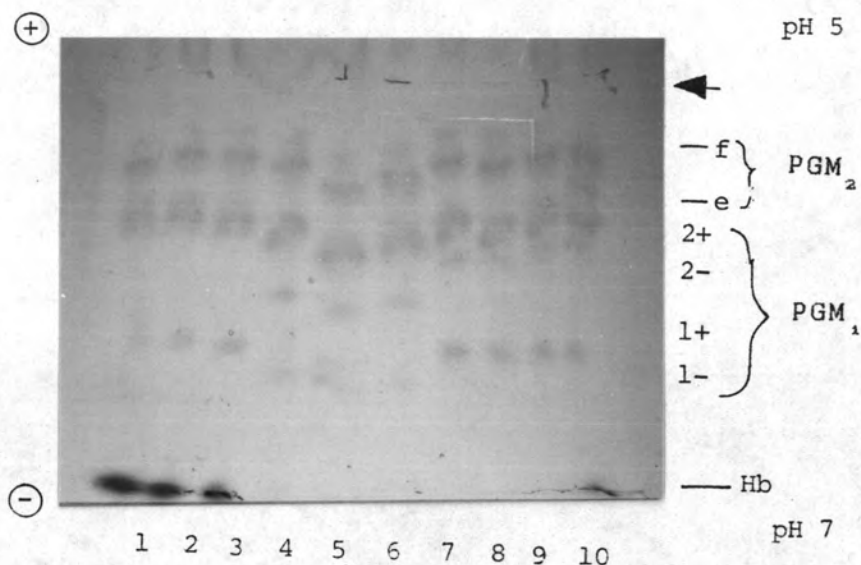
pH 5-7 ในการจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกใน
แนวตั้ง (Vertical midgelet electrophoresis) %T = 5.5, %C = 3.0

ใช้ 0.20 M NaOH เป็นอิเล็กโทรไลต์สำหรับขั้วลบ และ 0.05 M H₃PO₄ สำหรับ
ขั้วบวก ขนาดเจล 8 x 10 x 0.075 ซม. เจลโพลีเมอร์ไรซ์ด้วยแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 10%
ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 500 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ที่ 4 องศา-
เซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

ช่องที่ 1,2,3	PGM	ชนิด 1+
ช่องที่ 4,5,6	PGM	ชนิด 1-2-
ช่องที่ 7,8,9,10	PGM	ชนิด 1+2+



รูปที่ 7ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูป 7ข



รูปที่ 7ข ผลของไรโบฟลาวินต่อระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล pH 5-7

ในการจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วย อิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง

(Vertical midgelet electrophoresis) (สูตร II) %T = 5.5%, %C = 3.0%

ใช้ 0.20 M. NaOH เป็นอิเล็กโทรไลต์สำหรับขั้วลบ และ 0.05M H_3PO_4 สำหรับ

ขั้วบวก ขนาดเจล 8 x 10 x 0.075 ซม. เจลโพลีเมอร์ไรซ์ด้วย 20 มก.% ไรโบฟลาวิน

คักตาไฟฟ้าคงที่ที่ 500 โวลต์ กำลังไฟ 30 วัตต์, กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ที่ 4 องศาเซล-

เซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

ช่องที่ 1,2,3 PGM ชนิด 1+

ช่องที่ 4,5,6 PGM ชนิด 1-2-

ช่องที่ 7,8,9,10 PGM ชนิด 1+2+

จากรูปที่ 6 จะพบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 10% เป็นตัวโพลีเมอร์ไรซ์ เจล แถบของไอโซไซม์ของ PGM มีลักษณะเป็นคลื่น ไม่เป็นระเบียบ ถึงแม้จะมีการแยกแถบของ ไอโซไซม์ออกจากกันก็ไม่สามารถอ่านรูปแบบของ PGM ได้ แต่รูปที่ 7 ซึ่งใช้โรโบฟลาวิน 20 มก.% เป็นตัวโพลีเมอร์ไรซ์ เจล แถบของไอโซไซม์ของ PGM มีลักษณะเป็นแถบเส้นตรง resolution ดีขึ้น และสามารถอ่านรูปแบบของ PGM ได้ ดังนั้น โรโบฟลาวินจึงเป็นตัวโพลีเมอร์ไรซ์ เจลที่เหมาะสมกว่าในระบบนี้

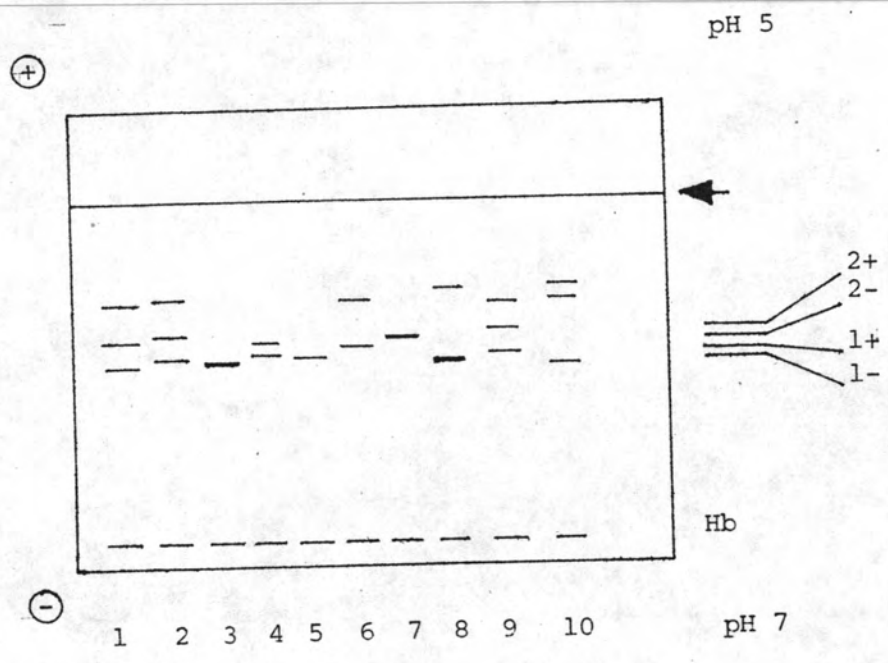
4. ความหนาของเจล จากการแปรความหนาของเจลระหว่าง 0.50 และ 0.75 มม. พบว่าที่ความหนาของเจลเท่ากับ 0.50 มม. จะสามารถให้กระแสไฟผ่านเจลได้สูงกว่า เมื่อความหนาของเจลเป็น 0.75 มม. (กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมป์ กำลังไฟฟ้า 10 วัตต์ และ กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมป์, กำลังไฟ 3 วัตต์ ตามลำดับ) ที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ เท่ากัน คือ 500 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง และพบว่า แถบของไอโซไซม์ของ PGM จะโผล่ดีขึ้น เมื่อใช้เจลหนา 0.50 มม.

เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยทั้งสี่ที่กล่าวมาแล้วพบว่าสามารถ จำแนกรูปแบบไอโซไซม์ของ PGM ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง บนโพลีอะครีลาไมด์ เจล pH 5-7 ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midget electrophoresis) ได้ถึง 4 ไอโซไซม์ คือ 1-, 1+, 2- และ 2+ (รูปที่ 7) โดยที่ไอโซไซม์ 1- จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบได้เร็วที่สุด รองมาคือไอโซไซม์ 1+, 2- และ 2+ ตามลำดับ จึงสามารถจำแนกรูปแบบของ PGM ได้ถึง 10 รูปแบบ

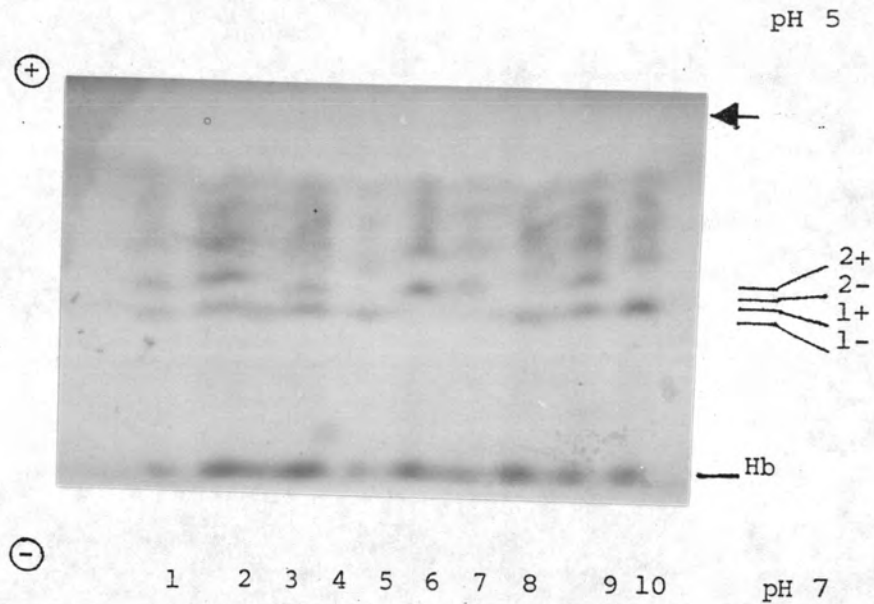
4.3.2 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งบนโพลีอะครีลาไมด์เจล pH 5-7 และ pH 5.0-6.5 ในอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF)

Mini IEF เป็นเครื่องมือขนาดเล็กสำหรับการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่งในแนวนอนจุดเด่นของระบบคือไม่ต้องมีอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) และสามารถทำได้ภายในเวลาสั้น

จากการทดลองจำแนก PGM ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง โดย mini IEF ที่ pH 5-7 พบว่า PGM ถูกจำแนกออกเป็นแถบที่ชัดเจน โดยที่แถบของไอโซไซม์ 1 และ 2 สามารถแยกออกจากกันได้ (ช่องที่ 1,2,4,9) ไอโซไซม์ของ PGM ได้ถูกจำแนกออกเป็นแถบที่ชัดเจน แต่แถบของไอโซไซม์ 1+ ยังไม่สามารถแยกออกจาก แถบของไอโซไซม์ 1- (ช่องที่ 3 และ 8) ในทำนองเดียวกัน แถบของไอโซไซม์ 2+ ก็ยังไม่สามารถแยกออกจากแถบของไอโซไซม์ 2- (ช่องที่ 7) ดังรูปที่ 8 เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดได้ จึงเปลี่ยนไปใช้ ampholine ที่มีช่วง pH แคบลง คือ 5.0-6.5 ผลการทดลองที่ได้ก็ยังไม่ดีขึ้น ดังรูปที่ 9 คือ ยังไม่สามารถจำแนกไอโซไซม์ 1+ ออกจากไอโซไซม์ 1- (ช่องที่ 3 และ 8) และไอโซไซม์ 2+ ออกจากไอโซไซม์ 2- ได้ (ช่องที่ 7)



รูปที่ 8ก โดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูปที่ 8ข



รูปที่ 8ข การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง บนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 5-7 ด้วยอิเล็กโทรโพรซิสขนาดเล็ก ที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF) %T = 5.5, %C = 4.5 ขนาดเจล 12.5 x 6.5 x 0.04 ซม.

ใช้ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ 15 นาที, 200 โวลต์ 15 นาที และ 450 โวลต์

60 นาที (<—) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

ช่องที่ 1 PGM ชนิด 1-2-

ช่องที่ 2,9 PGM ชนิด 1+2+

ช่องที่ 3,8 PGM ชนิด 1+1-

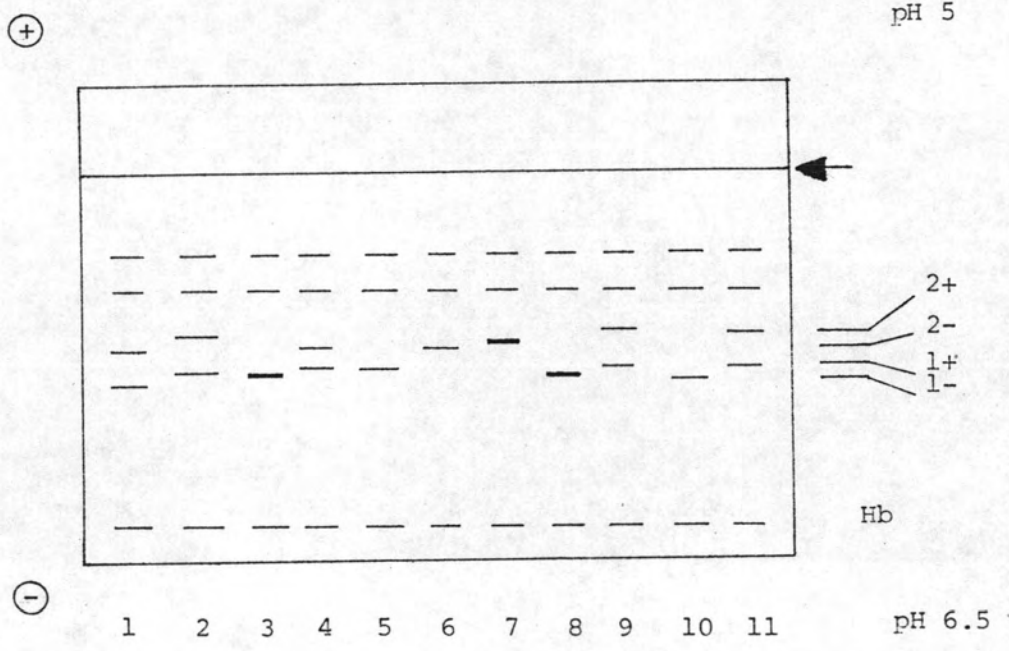
ช่องที่ 4 PGM ชนิด 1+2-

ช่องที่ 5 PGM ชนิด 1+

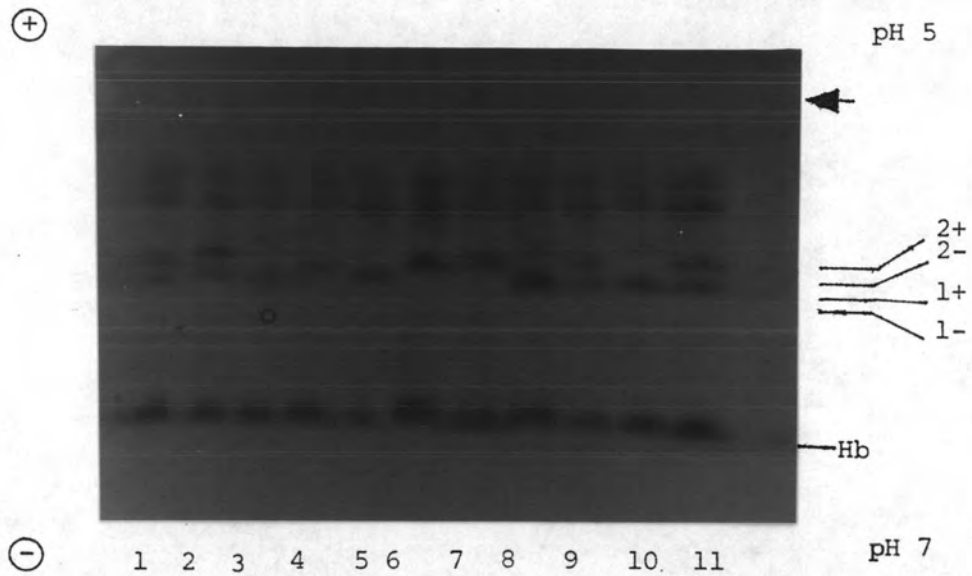
ช่องที่ 6 PGM ชนิด 2-

ช่องที่ 7 PGM ชนิด 2+2-

ช่องที่ 10 PGM ชนิด 1-



รูปที่ 9ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูป 9ข



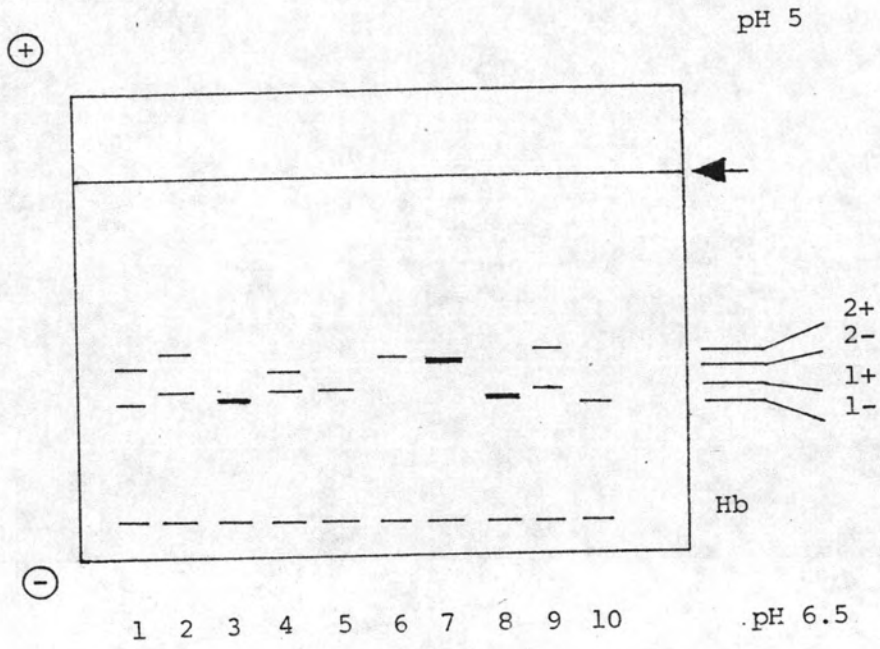
รูปที่ 9ข การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5.0-6.5 ด้วยอิเล็กโทรโพรสิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF) %T = 5.5, %C = 4.5 ขนาดเจล 12.5 x 6.5 x 0.04 ซม.

ใช้ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ 15 นาที, 200 โวลต์ 15 นาที, และ 450 โวลต์

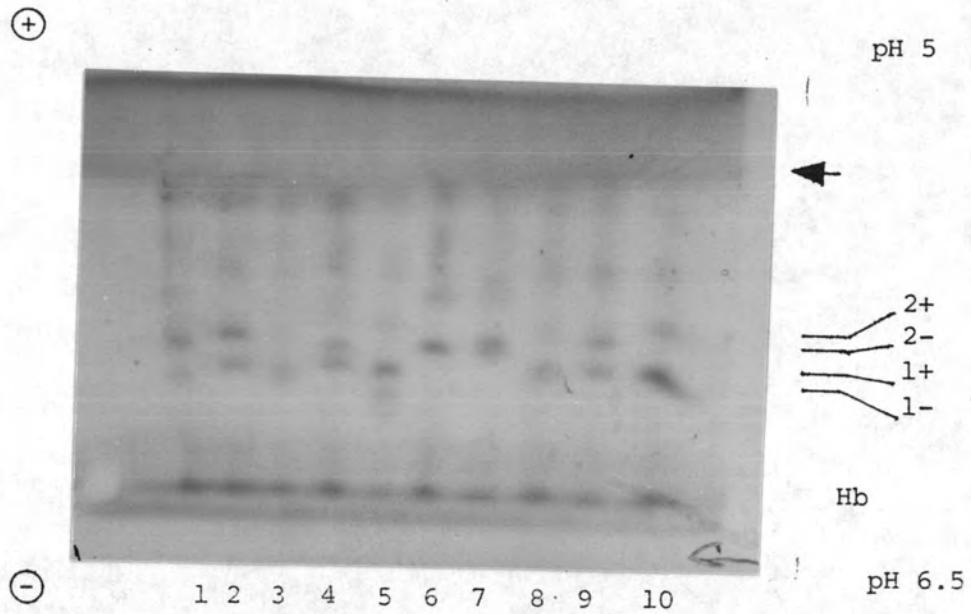
60 นาที (<—) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

ช่องที่ 1	PGM ชนิด 1-2-
ช่องที่ 2,9,11	PGM ชนิด 1+2+
ช่องที่ 3,8	PGM ชนิด 1+1-
ช่องที่ 4	PGM ชนิด 1+2-
ช่องที่ 5	PGM ชนิด 1+
ช่องที่ 6	PGM ชนิด 2-
ช่องที่ 7	PGM ชนิด 2+2-
ช่องที่ 10	PGM ชนิด 1-

เพื่อจะแยกแถบ 1+, 1- และ 2+, 2- ออกจากกัน จึงใช้ spacer N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N-3-propanesulfonic acid (EPPS) ช่วยในการจัด pH ระหว่าง 5.5-6.0 (Gill และ Sutton, 1985) ให้กว้างขึ้น โดยใช้ความเข้มข้นของ spacer ในปริมาณ 1.2% (Budowle et al, 1986) ได้ผลดังรูปที่ 10 คือ ช่วงห่างระหว่างแถบไอโซไซม์ต่าง ๆ กว้างขึ้น resolution ดีขึ้น แต่ก็ยังไม่สามารถจำแนกแถบของไอโซไซม์ 1+ ออกจากแถบของไอโซไซม์ 1- (ช่องที่ 3 และ 8) และแถบไอโซไซม์ 2+ ออกจาก แถบของไอโซไซม์ 2- (ช่องที่ 7) เพียงแต่จะเห็นแถบรวมของไอโซไซม์ 1+ และ 1- กว้างและเข้มกว่าปกติ เช่นเดียวกับแถบรวมของไอโซไซม์ 2+ และ 2- นั่นคือ การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์ เจล pH 5.0-6.5 โดยมี EPPS เป็น spacer ในความเข้มข้น 1.2% โดยอิเล็กโทรโฟรีซิส ขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน สามารถจำแนกไอโซไซม์ 1 และ 2 ออกจากกันได้ แต่ยังไม่สามารถจำแนกไอโซไซม์ 1+ ออกจาก 1- และไอโซไซม์ 2+ ออกจาก 2- ได้



รูปที่ 10ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูป 10ข



รูปที่ 10ข การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล

ที่ pH 5.0-6.5 ที่มี 1.2% EPPS โดย อิเล็กโทรโพรซิส ขนาดเล็กที่แยกใน
แนวนอน (Horizontal mini IEF) %T = 5.5, %C = 4.5 ขนาดเจล
12.5 x 6.5 x 0.5 ซม.

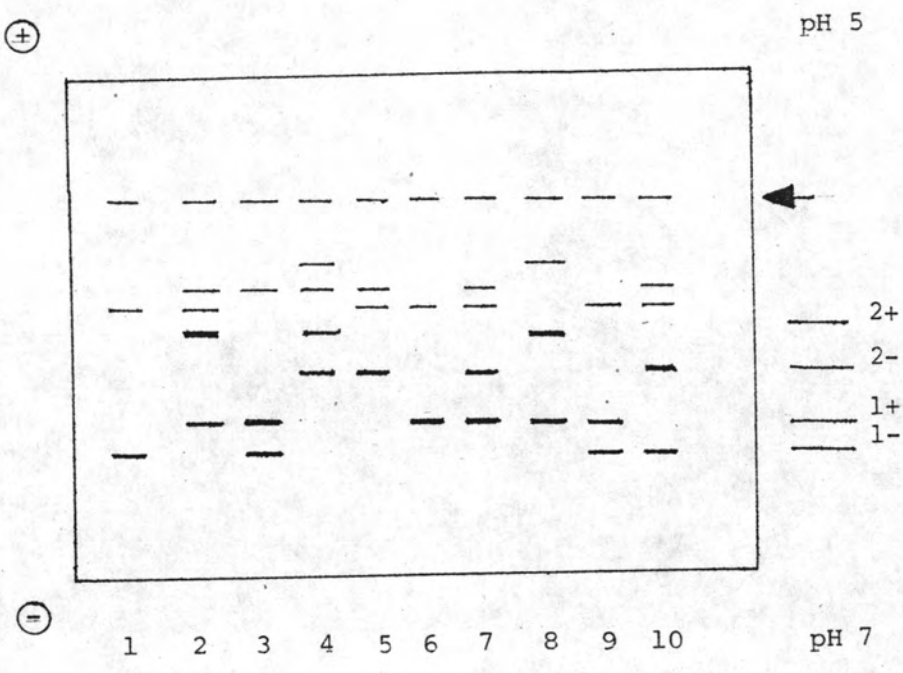
ใช้ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ 15 นาที 200 โวลต์ 15 นาที และ
450 โวลต์ 60 นาที (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

ช่องที่ 1	PGM ชนิด 1-2-
ช่องที่ 2, 9	PGM ชนิด 1+2+
ช่องที่ 3, 8	PGM ชนิด 1+1-
ช่องที่ 4	PGM ชนิด 1+2-
ช่องที่ 5	PGM ชนิด 1+
ช่องที่ 6	PGM ชนิด 2+
ช่องที่ 7	PGM ชนิด 2+2-
ช่องที่ 10	PGM ชนิด 1-

4.3.3 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยอิเล็กโทรโฟรีซิส

ขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis)

จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล ในข้อ 4.3.1 และข้อ 4.3.2 พบว่า การจำแนก PGM ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงที่ pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midget electrophoresis) ไอโซไซม์ 1+, 1-, 2+ และ 2- สามารถแยกออกจากกันได้ โดยไอโซไซม์ 1- จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบได้เร็วที่สุด รองมาคือไอโซไซม์ 1+, 2- และ 2+ ตามลำดับ และสามารถอ่านรูปแบบที่ต่างกันของ PGM ได้ แต่พบว่าไอโซไซม์ของ PGM ใน locus ที่สอง (PGM_2) มีแอมพลิจูดที่เด่นกว่า PGM ใน locus ที่หนึ่ง (PGM_1) อย่างชัดเจน ส่วนในข้อ 4.3.2 การจำแนก PGM โดยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงที่ pH 5-7 และที่ pH 5.0-6.5 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF) พบว่าไอโซไซม์ 1 และ 2 สามารถแยกออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถแยกไอโซไซม์ 1+ ออกจาก 1- และไอโซไซม์ 2+ ออกจาก 2- แม้ว่าจะใช้ spacer คือ EPPS ช่วยในการจัดเรียง pH ก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะห่างระหว่างขั้วบวก และขั้วลบน้อยเกินไป ทำให้การจัดเรียง pH ภายในเจลอยู่ชิดกันมาก ดังนั้นจึงทำการทดลองจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) บนโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยใช้ %T = 5.5, %C = 4.5 ขนาดของเจล 15 x 20 x 0.01 ซม., 4.8% Ampholine pH 5-7 ที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 2,000 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์, กระแสไฟฟ้า 8 มิลลิแอมป์ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ได้ผลดังรูปที่ 11 จากรูปที่ 11 พบว่า อิเล็กโทรโฟรีซิสระบบนี้ สามารถจำแนก PGM ออกได้ดี ไอโซไซม์ 1 และ 2 สามารถแยกออกจากกัน (ช่องที่ 2,7,8,10) นอกจากนี้ยังสามารถแยกไอโซไซม์ 1+ ออกจากไอโซไซม์ 1- (ช่องที่ 3,9) และไอโซไซม์ 2+ ออกจากไอโซไซม์ 2- (ช่องที่ 4) ได้อย่างชัดเจน โดยที่ ไอโซไซม์ 1- จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบได้เร็วที่สุด รองมาคือไอโซไซม์ 1+, 2- และ 2+ ตามลำดับ

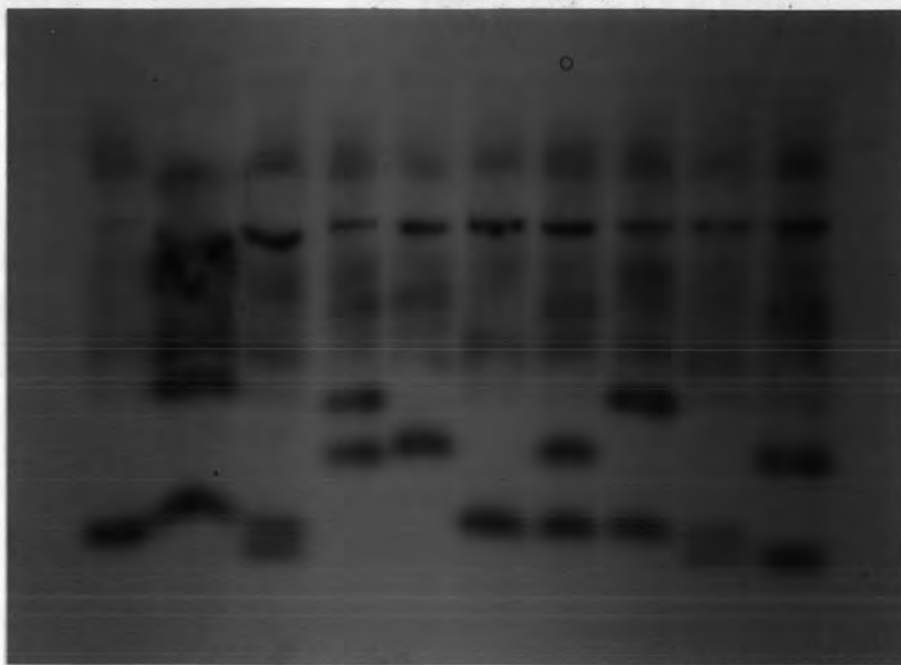


รูปที่ 11ก ไตอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูป 11ข

+

pH5

62



→ 2+
 — 2-
 — 1+
 — 1-

-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

pH7

รูปที่ 11ข การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง บนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) %T=5.5, %C=4.5

ใช้ 1% Ethanolamine เป็นอิเล็กโทรไลต์สำหรับขั้วลบและ 1% Acetic acid สำหรับขั้วบวก ขนาดเจล 15 x 20 x 0.01 ซม. ใช้ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 2000 โวลต์, กำลังไฟ 10 วัตต์, กระแสไฟฟ้า 8 มิลลิแอมป์, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง ช่องที่ 1-10 แสดงรูปแบบ PGM ชนิด 1-, 1+2+, 1+1-, 2+2-, 2-, 1+, 1+2-, 1+2+, 1+1-, 1-2- ตามลำดับ

ช่องที่ 1	PGM	ชนิด 1-
ช่องที่ 2,8	PGM	ชนิด 1-2+
ช่องที่ 3,9	PGM	ชนิด 1+1-
ช่องที่ 4	PGM	ชนิด 1+1-
ช่องที่ 5	PGM	ชนิด 2+2-
ช่องที่ 6	PGM	ชนิด 1+
ช่องที่ 7	PGM	ชนิด 1+2-
ช่องที่ 10	PGM	ชนิด 1-2+

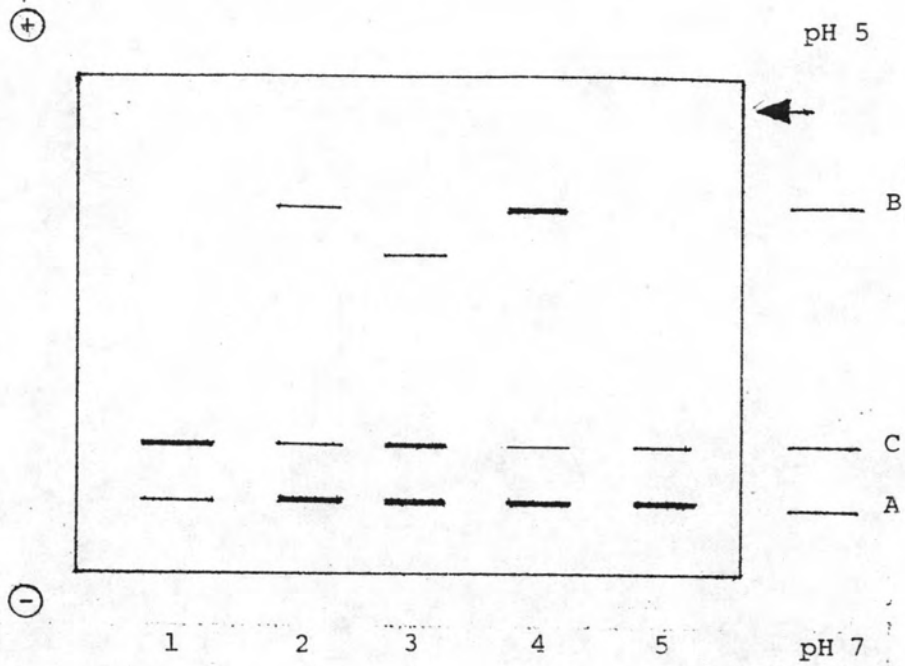
จากรูปที่ 11 อาจสรุปได้ว่าไอโซอิเล็กทริกพ้อย์ของบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอนสามารถจำแนกรูปแบบของไอโซไซม์ของ PGM ได้ถึง 10 รูปแบบ คือ 1-, 1+, 1+1-, 1-2-, 1-2+, 1+2-, 1+2+, 2+, 2- และ 2+2- ตามลำดับ

4.4 การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกพ้อย์

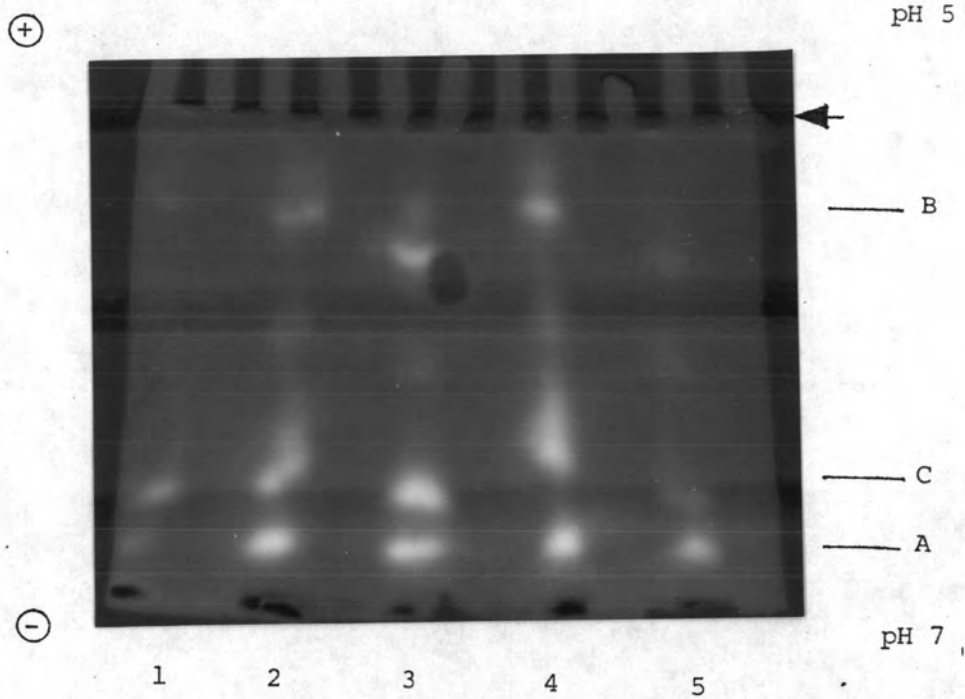
4.4.1 ไอโซอิเล็กทริกพ้อย์บนโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยอิเล็กโทรโฟรีซิส

ขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midget electrophoresis)

จากการทดลองที่ผ่านมาข้อสรุปจากการจำแนก PGM คือ ไอโซอิเล็กทริกพ้อย์เป็นวิธีที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ไอโซอิเล็กทริกพ้อย์ในการจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วย โดยใช้ pH 5-7 และ pH 4-8 และใช้เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็ก (8 x 10 x 0.075 ซม.) ที่แยกในแนวตั้ง %T=5.5, %C=3.0 คัดดาไฟฟ้าคงที่ที่ 500 โวลต์, กำลังไฟ 10 วัตต์, กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมป์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 12 และ 13 ตามลำดับ จากรูปที่ 12 พบว่าระบบนี้สามารถจำแนกไอโซไซม์ A, B และ C ของ EAP ออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถอ่านรูปแบบของ EAP ได้ เนื่องจากมีแถบไอโซไซม์ปรากฏอยู่ ณ ตำแหน่งเดียวกับไอโซไซม์ C ให้เห็นเกือบทุกรูปแบบของ EAP (ช่องที่ 2, 3 และ 4) จากส่วนในรูปที่ 13 เป็นการจำแนกรูปแบบ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกพ้อย์บนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยเครื่องมือเดียวกัน พบว่ายังไม่สามารถจำแนกไอโซไซม์ A, B และ C ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากช่วงระหว่าง pH กว้างมาก ในขณะที่ระยะห่างระหว่างขั้วบวกและขั้วลบแคบ



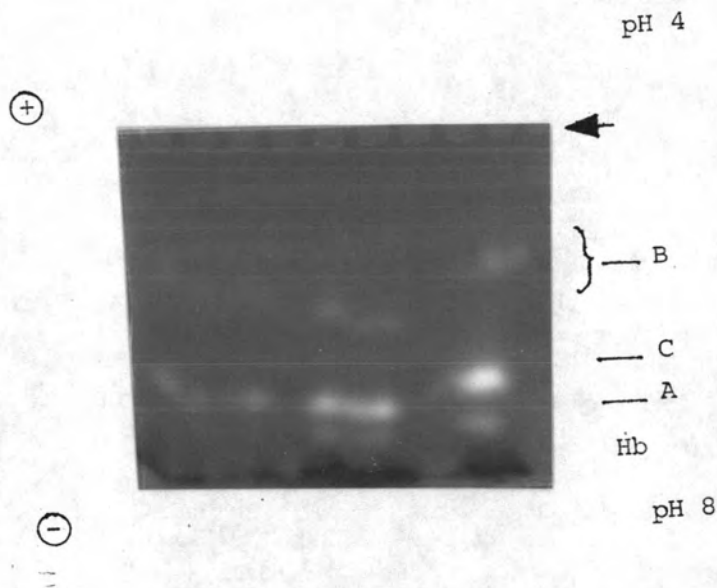
รูปที่ 12ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ EAP ในรูปที่ 12ข



รูปที่ 12ข การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลามัดเจล pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโพรซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midgelet electrophoresis) %T=5.5 %C=2.8

ใช้ 0.20 M NaOH เป็นอิเล็กโทรไลต์สำหรับขั้วลบ และ 0.05 M H_3PO_4 สำหรับขั้วบวก ขนาดเจล 8 x 10 x 0.075 ซม. ศักไฟฟ้าคงที่ที่ 500 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชม. (←) แสดงตำแหน่งที่ apply

ช่องที่ 1	EAP ชนิด C
ช่องที่ 2,5	EAP ชนิด A
ช่องที่ 3	EAP ชนิด CA
ช่องที่ 4	EAP ชนิด BA



รูปที่ 13 การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล
ที่ pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midiget
electrophoresis) %T=5.5, %C=2.8

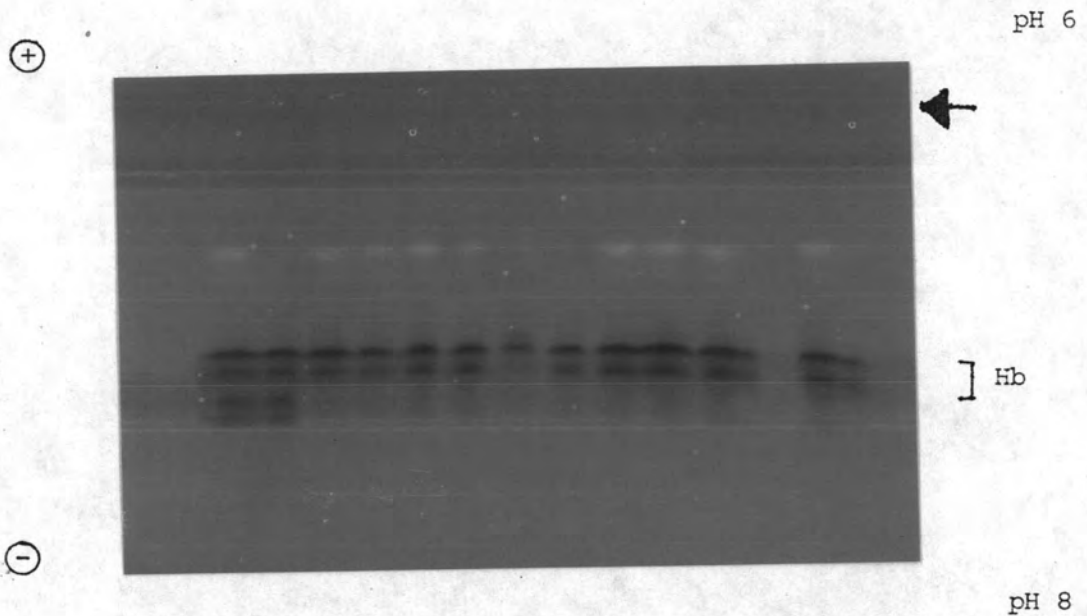
ใช้ 0.20 M NaOH เป็นอิเล็กโทรไลต์สำหรับขั้วลบ และ 0.05 M H_3PO_4 สำหรับ
ขั้วบวก ขนาดเจล 8 x 10 x 0.075 ซม. คัดตาไฟฟ้าคงที่ที่ 500 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์
กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (←) แสดงตำแหน่ง
ที่ apply เลือดตัวอย่าง

จากรูปที่ 12 และรูปที่ 13 จะเห็นว่า การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโพลีสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 5-7 และ pH 4-8 ด้วย อิเล็กโทรโฟรีซิสที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midget electrophoresis) %T=5.5, %C=3.0 นั้นพบว่าที่ pH 5-7 สามารถจำแนกรูปแบบของไอโซไซม์ของ EAP ออกได้ชัดเจนกว่าที่ pH 4-8 ซึ่งไม่สามารถจำแนกรูปแบบของไอโซไซม์ของ EAP ได้

4.4.2 ไอโซอิเล็กทริกโพลีสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยอิเล็กโทรโฟรีซิส

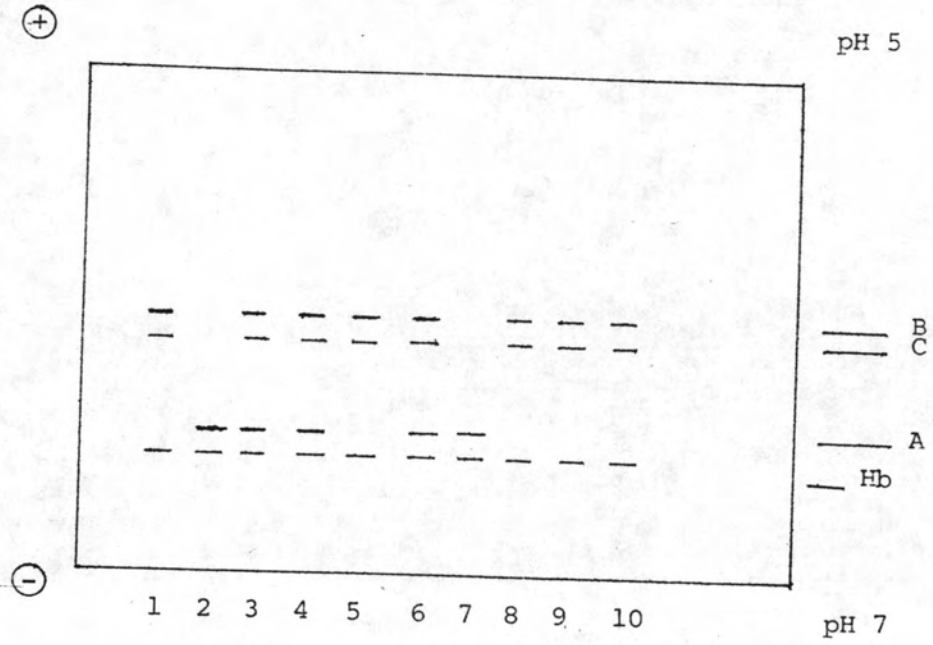
ขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF)

เนื่องจาก mini IEF เป็นอุปกรณ์สำหรับทำไอโซอิเล็กทริกโพลีสซิงที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นจึงเลือกช่วง pH ที่ใช้สำหรับการจำแนกรูปแบบของ EAP ให้มีช่วงแคบลง โดยทดลองจำแนกรูปแบบของ EAP โดยใช้ pH 6-8 บนโพลีอะครีลาไมด์เจลขนาด 12.5 x 6.5 x 0.04 ซม. ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ 15 นาที 200 โวลต์ 15 นาที และ 450 โวลต์ 60 นาที ติดตามผลโดยการย้อมดูแอกติวิตีของ EAP ดังข้อ 3.5 ได้ผลดังรูปที่ 14

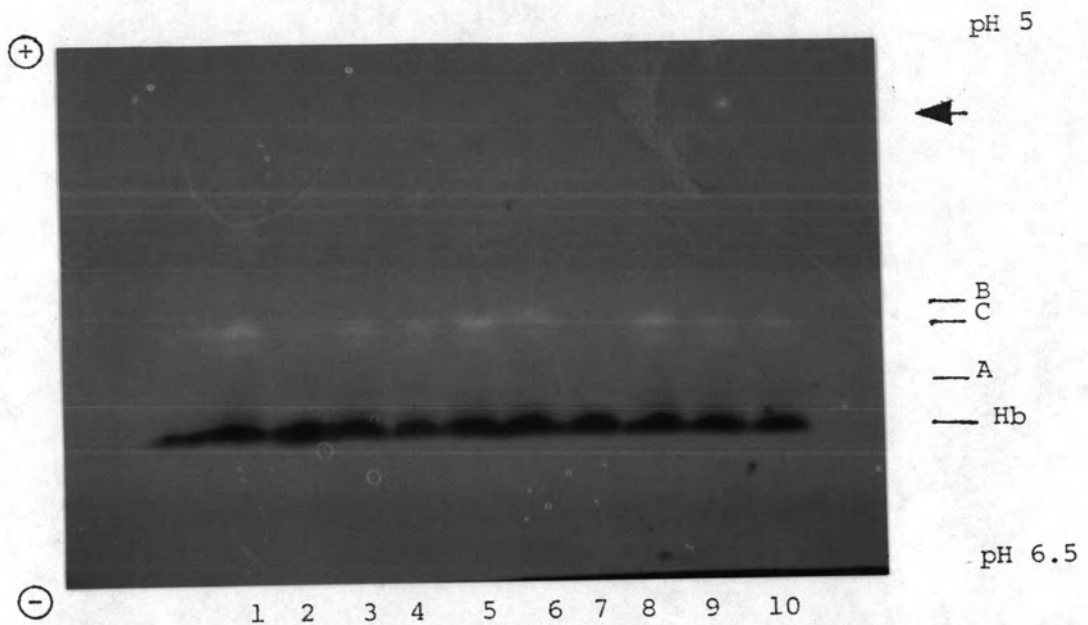


รูปที่ 14 การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 6-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF) %T=5.5, %C=4.5 ขนาดของเจล 12.5 x 6.5 x 0.04 ซม. ใช้ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ 15 นาที 200 โวลต์ 15 นาที และ 450 โวลต์ 60 นาที ตามลำดับ (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

จากรูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกรูปแบบของไอโซไซม์ของ EAP ออกจากกันได้เพียง 2 ไอโซไซม์เท่านั้น (เห็นเพียง 2 แถบ) ดังนั้นจึงเปลี่ยนช่วง pH ใหม่ โดยใช้ 5.0-6.5 แล้วแยกในเงื่อนไขเดียวกับรูปที่ 14 ได้ผลดังรูปที่ 15



รูปที่ 15ก ไตอะแกรมแสดงรูปแบบของ EAP ในรูป 15ข



รูปที่ 15ข การจำแนกรูปแบบ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5.0-6.5 โดยอิเล็กโทรโพรสิส ขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF) %T=5.5, %C=4.5 ขนาดเจล 12.5 x 6.5 x 0.04 ซม.

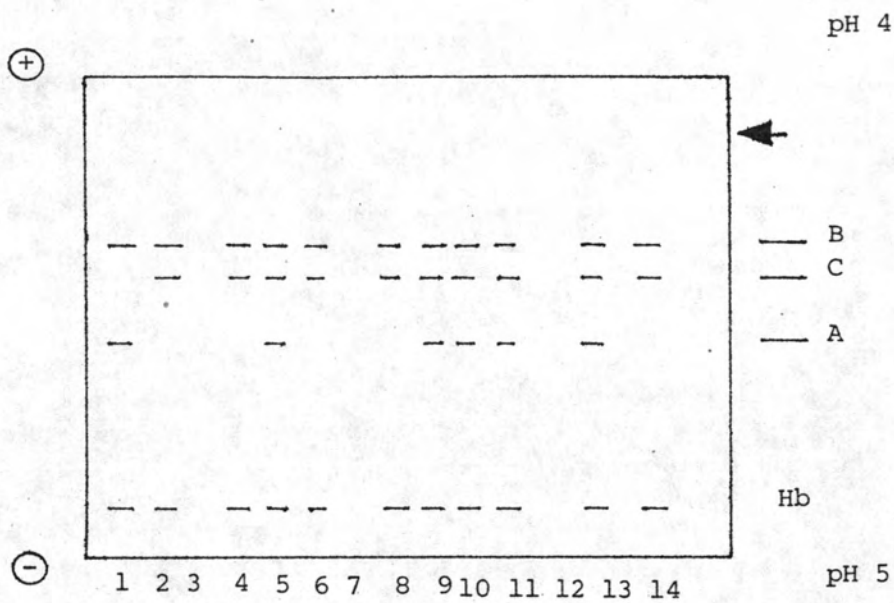
ใช้ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ 15 นาที 200 โวลต์ 15 นาที และ 450 โวลต์ 60 นาที ตามลำดับ (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

ช่องที่ 2,7	EAP ชนิด A
ช่องที่ 1,5,8,9,10	EAP ชนิด B
ช่องที่ 3,4,6	EAP ชนิด BA

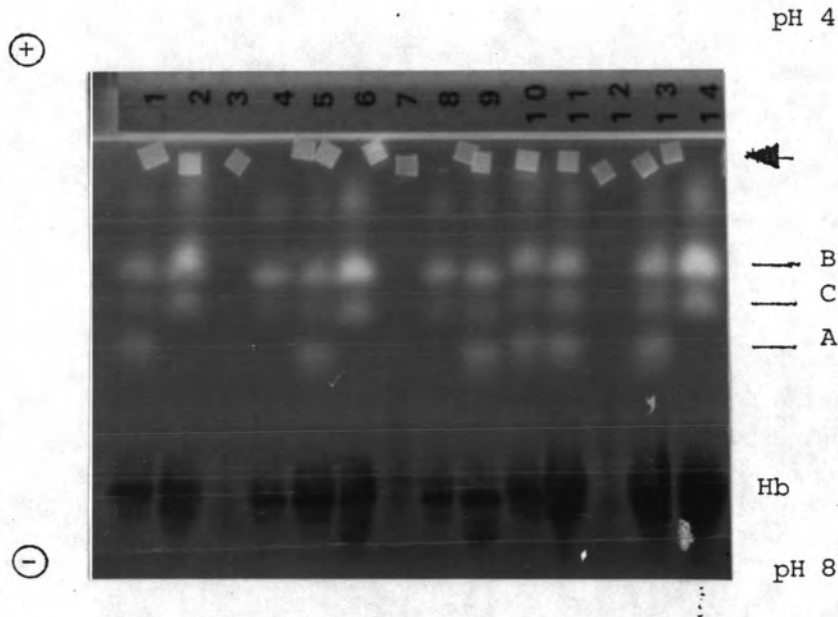
จากรูปที่ 15x แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกรูปแบบของไอโซไซม์ของ EAP ทั้งสาม ไอโซไซม์ออกจากกันได้ โดยไอโซไซม์ A จะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด (ใกล้ขั้วลบที่สุด) รองมาคือ ไอโซไซม์ C และ B แต่แถบของไอโซไซม์ A จะเคลื่อนกลางมากโดยเฉพาะเมื่อไอโซไซม์ A เป็น heterozygote (ช่องที่ 3,4,6) นั่นคือ การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัส ซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF) ที่ pH 5.0-6.5 สามารถแยกไอโซไซม์ของ EAP เป็น 6 รูปแบบ (แต่ไม่มีเลือด ตัวอย่างของ EAP ชนิด C, CB และ CA)

4.4.3 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis)

เนื่องจากการจำแนกรูปแบบของ EAP ในข้อ 4.4.2 ยังได้ resolution ไม่ดีเท่าที่ควรจึงทำการทดลองจำแนกรูปแบบ EAP ด้วย ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber eletrophoresis) ที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 2000 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 8 มิลลิแอมป์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ 1% Ethanolamine เป็นอิเล็กโทรไลต์สำหรับขั้วลบ และ 1% Acetic acid เป็นอิเล็กโทรไลต์สำหรับขั้วบวก ได้ผลดังรูปที่ 16x



รูปที่ 16ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ EAP ในรูปที่ 16ข



รูปที่ 16ข การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล
pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal
chamber electrophoresis) %T=5.5, %C=4.5

ใช้ 1% Ethanolamine เป็นอิเล็กโทรไลต์สำหรับขั้วลบ และใช้ 1% Acetic acid
สำหรับขั้วบวกขนาดของเจล 15 x 20 x 0.01 ซม. คักตาไฟฟ้าคงที่ที่ 2000 โวลต์ กำลังไฟ
10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 8 มิลลิแอมแปร์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

ช่องที่ 2, 4, 6, 8, 14 EAP ชนิด B

ช่องที่ 1, 5, 9, 10, 11, 13 EAP ชนิด BA

รูปที่ 16 แสดงถึงรูปแบบของไอโซไซม์ A, B และ C ของ EAP ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน จะเห็นว่าไอโซไซม์ A, B และ C สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน โดยไอโซไซม์ A จะเคลื่อนที่เร็วที่สุด (ใกล้ขั้วลบที่สุด) รองมาคือไอโซไซม์ C และ B ตามลำดับ resolution ดี สามารถอ่านรูปแบบได้แน่นอนโดยสังเกตจากความเข้ม (intensity) ของแต่ละแถบไอโซไซม์

ดังนั้นจะเห็นว่าไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) สามารถจำแนกไอโซไซม์ของ EAP ออกจากกันได้ 3 ไอโซไซม์ คือ A, B และ C ตามลำดับ และแต่ละไอโซไซม์มีความคมชัดกว่าการจำแนกรูปแบบ EAP ในข้อ 4.4.1 และ ข้อ 4.4.2 เช่นนี้อาจทำให้สามารถจำแนกรูปแบบของ EAP ได้ถึง 6 รูปแบบคือ A, B, C, BA, CA, และ CB (ไอโซไซม์ C จะพบน้อยมากในประชากรแถบเอเชีย แต่จะพบได้บ้างแถบยุโรป)

4.5 Simultaneous typing of polymorphic enzymes

งานทางด้านนิติเวชนั้นในบางครั้งไม่สามารถรอได้ ดังนั้นหากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพียงครั้งเดียว สามารถให้ผลการจำแนกโพลิมอร์ฟิกเอนไซม์ได้หลายชนิดก็จะมีประโยชน์มาก

4.5.1 การทำ Simultaneous typing ของ PGM และ EAP โดยวิธี

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวตั้ง (Vertical midget electrophoresis)

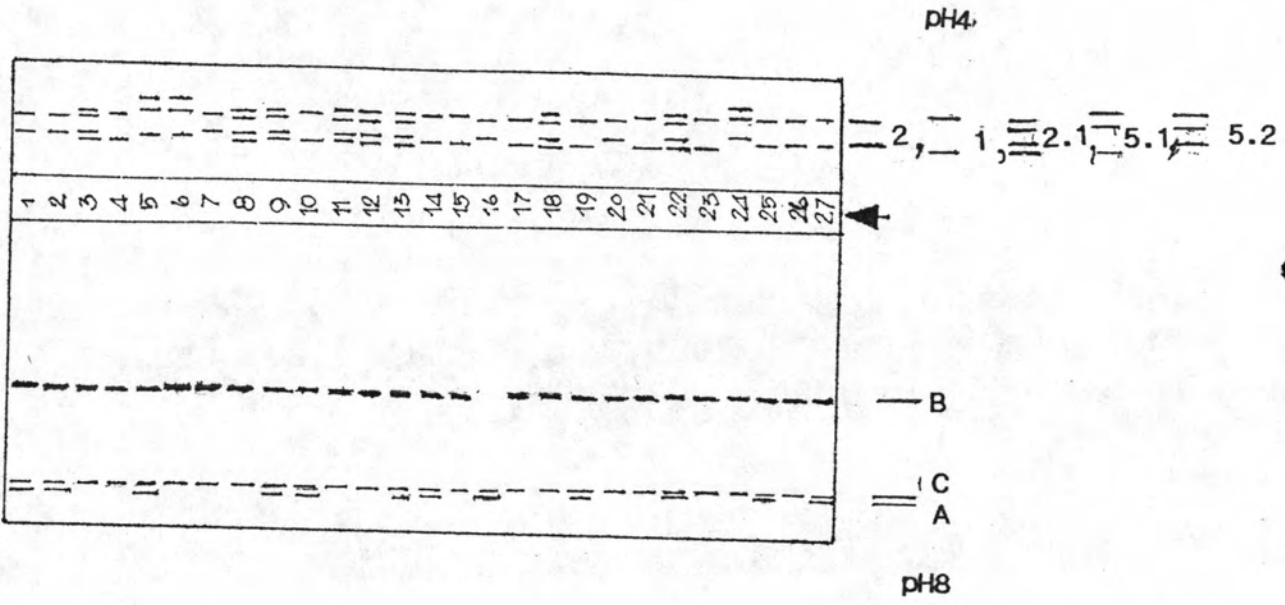
จากการทดลองจำแนก PGM และ EAP พร้อมกัน โดยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล pH 5-7 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่ run ในแนวตั้ง (vertical midget electrophoresis) $\%T=5.6$, $\%C=2.9$ คัดตาไฟฟ้าคงที่ที่ 500 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมป์ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการแยก นำเจลแผ่นหนึ่งไปย้อมดูแอดคทีวิตีของ PGM ดังข้อ 3.4 อีกแผ่นหนึ่งไปย้อมดู

แอดดีวิตีของ EAP ดังข้อ 3.5 พบว่าสามารถจำแนก ไอโซไซม์ 1 และ 2 ของ PGM ออกจากกัน แยกไอโซไซม์ 1+ ออกจากไอโซไซม์ 1- และแยกไอโซไซม์ 2+ ออกจากไอโซไซม์ 2- ส่วน EAP ก็สามารถจำแนกรูปแบบของไอโซไซม์ A,B และ C ออกจากกันได้ ได้เช่นเดียวกับการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงของแต่ละ เอนไซม์ดังรูปที่ 7 และรูปที่ 12 ตามลำดับ

4.5.2 การทำ Simultaneous typing ของ EAP และ EsD โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิส ขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis)

ในการทำ Simultaneous typing ของ EAP และ EsD ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) นั้นได้ใส่ spacer N-2-Hydroxyethylpiperazin N-2-ethanesulfonic acid (HEPES) ในปริมาณ 3.14% โดย HEPES มีค่า $pK = 7.5$ ในการทดลองครั้งนี้ หลังจากเตรียมเจลพร้อมแล้วก็นำไป pre-run ที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 700 โวลต์ กำลังไฟฟ้า 5 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 150 มิลลิแอมป์ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลออกมา apply เลือดตัวอย่างโดยให้ห่างจากขั้วบวกประมาณ 3.5 ซม. แล้วนำไปผ่านกระแสไฟฟ้าที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 2,500 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 150 มิลลิแอมป์ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นนำไปย้อมดูแอดดีวิตีของ EAP ดังข้อ 3.5 และ EsD ดังข้อ 3.6 โดยเทวุ้นที่มีส่วนผสมในการ ตรวจวัด EAP ลงบนเจลระหว่างจุดเริ่มต้น (origin) กับขั้วลบ หลังจากอุ่นแข็งตัวจึงเทวุ้นสำหรับตรวจวัด EsD ลงระหว่างจุดเริ่มต้นกับขั้วบวก อ่านผล EsD ภายใตแสง UV ทันที เนื่องจากแถบของเอนไซม์นี้แพร่กระจายเร็วแล้วอ่านรูปแบบของ EAP ภายใตแสง UV ตามลำดับ

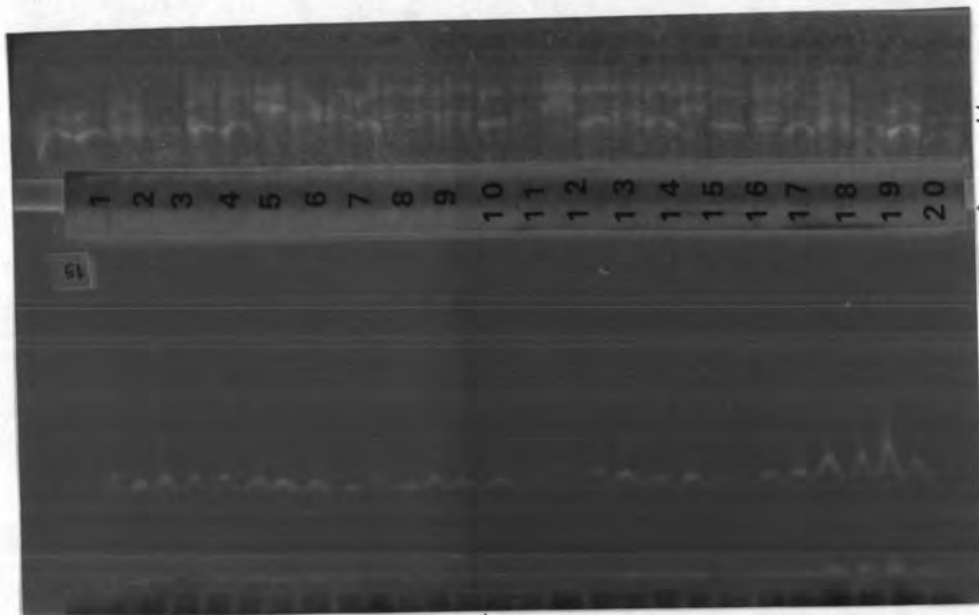
⊕



⊖

รูปที่ 17ก โดยแกรมแสดงรูปของ EAP, ESD ในรูปที่ 17ข

+



= 2, 1, 2, 1, 5, 1, 5.2

— B

== A

pH8

-

รูปที่ 17 ข Simultaneous typing ของ EAP และ EsD ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง บนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 4-8 และใช้ 3.14% HEPES เป็น spacer ในอิเล็กโตรโพรซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) % T=5.5, % C=4.5

ใช้ 1% Ethanolamine เป็นอิเล็กโตรไลต์สำหรับขั้วลบ และ 1% Acetic acid สำหรับขั้วบวก ขนาดของเจล 15 x 20 x 0.01 ซม. pre-run ที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 700 โวลต์ กำลังไฟ 5 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 150 มิลลิแอมแปร์ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ run ที่ศักดาไฟฟ้าคงที่ที่ 2500 โวลต์ กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 150 มิลลิแอมแปร์ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที (←) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

ช่องที่ 16	EAP ชนิด A
ช่องที่ 3,4,6,7,8,11,12,15,17,18,20,23,24,26	EAP ชนิด B
ช่องที่ 1,2,5,9,10,13,14,19,22,25,27	EAP ชนิด BA
ช่องที่ 1,2,4,10,14,15,17,19,21,23,25,26,27	EsD ชนิด 1
ช่องที่ 7,16,20	EsD ชนิด 2
ช่องที่ 3,8,9,11,12,13,18,22	EsD ชนิด 2.1
ช่องที่ 5,6	EsD ชนิด 5.1
ช่องที่ 24	EsD ชนิด 5.2

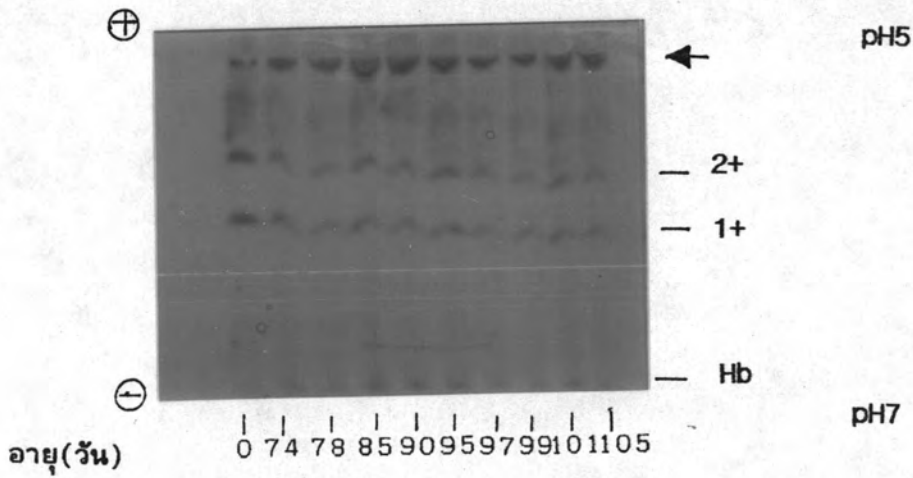
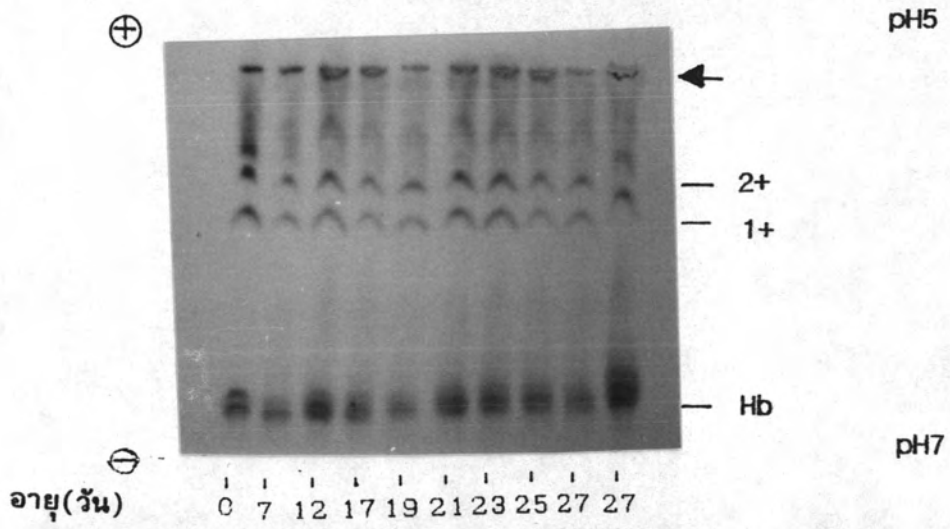
จากรูปที่ 17 พบว่าเมื่อมี spacer รูปแบบของ EAP จะเคลื่อนไปทางขั้วลบมากขึ้น (รูปที่ 16) และปรากฏอยู่ทางขั้วลบของแผ่นเจล สามารถแยกไอโซไซม์ A, B และ C ออกจากกันอย่างชัดเจน โดยไอโซไซม์ A จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบมากที่สุด และไอโซไซม์ B จะเคลื่อนที่ได้ช้าที่สุด แถบของแต่ละไอโซไซม์มีความคมชัด และมีความเข้ม (intensity) พอที่จะสามารถอ่านรูปแบบที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างได้อย่างชัดเจน ให้ resolution ที่ดี ส่วนรูปแบบของ EsD จะปรากฏอยู่ทางขั้วบวกของแผ่นเจล โดย EsD ที่เป็น homozygote phenotypes จะปรากฏให้เห็น 2 แถบ ไอโซไซม์ ในขณะที่ heterozygote phenotypes จะปรากฏให้เห็น แถบไอโซไซม์ของทั้งสองไอโซไซม์ แถบไอโซไซม์ของ EsD ที่ได้จะมีการแพร่กระจายมากกว่าของ EAP (แถบไอโซไซม์ของ EsD จะมีความคมชัดหลังจากเหล็บสเตอร์หลงไปทันที) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรีบอ่านรูปแบบของ EsD ทันที

ดังนั้นในการทำ Simultaneous typing ของ EAP และ EsD ด้วยไอโซอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งบนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 4-8 และใช้ 3.14% HEPES เป็น spacer จึงประหยัดเวลา เลือดตัวอย่าง และค่าใช้จ่ายในการทำแต่ละครั้ง

4.6 การศึกษาความเสถียรของแอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ

4.6.1 การศึกษาความเสถียรของ PGM

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการจำแนก PGM จากข้อ 4.3 แล้ว ได้นำระบบดังกล่าวมาศึกษาความเสถียรของ PGM จากคราบเลือด โดยสกัด PGM จากคราบเลือดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในช่วงเวลาเก็บต่างๆกัน(0-105 วัน)แล้วนำไปเปรียบเทียบกับรูปแบบด้วยวิธีไอโซอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งบนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยอิเล็กโตรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) %T=5.5, %C=4.5 ขนาดเจล 10 x 30 x 0.01 ซม. (จำนวน 30 ตัวอย่าง/เจล) ดังข้อ 3.9.3 ใช้ 1% Ethanolamine เป็นอิเล็กโตรไลต์สำหรับขั้วลบ และ 1% Acetic acid สำหรับขั้วบวก กำลังไฟ 10 วัตต์ กระแสไฟฟ้า 8 มิลลิแอมป์ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ได้ผลดังรูปที่ 18

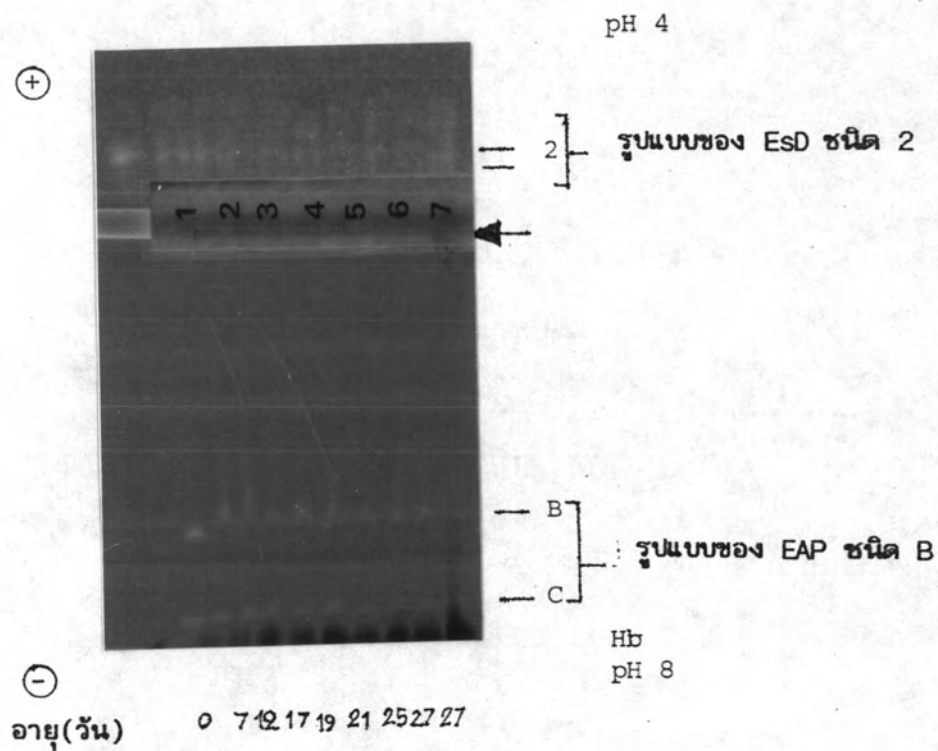


รูปที่ 18 แสดงรูปแบบของ PGM ชนิด 1+2+ ในคราบเลือด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 0-105 วัน

รูปที่ 18 แสดงถึงรูปแบบไอโซไซม์ของ PGM ชนิด 1+2+ อายุตั้งแต่ 0-105 วัน ที่อุณหภูมิห้องพบว่าความเข้มของแถบไอโซไซม์ 1+ และ 2+ ยังคงสม่ำเสมอถึงประมาณวันที่ 74 จากนั้นแล้วจะลดลง แต่ก็ยังเห็นชัดพอที่จะอ่านรูปแบบของ PGM ได้ถึงวันที่ 105 นั่นคือ PGM มีความเสถียรค่อนข้างสูงที่อุณหภูมิห้อง จึงมีประโยชน์อย่างมากที่จะเป็นตัวบ่งชี้ในงานพิสูจน์หลักฐาน

4.6.2 การศึกษาความเสถียรของ EAP และ EsD

จากการที่สามารถทำการจำแนกรูปแบบของ EAP และ EsD ได้พร้อมกัน ดังข้อ 4.5.2 จึงได้นำระบบดังกล่าวข้างต้นมาศึกษาความเสถียรของ EAP และ EsD จากคราบเลือดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในช่วงเวลาต่างๆ กัน (0-27 วัน) โดยใช้ 0.05 M.DTT 40 ไมโครลิตร สกัดเอนไซม์ดังกล่าวจากคราบเลือดบนผ้าขนาด 0.4x0.4 ซม² เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเปรียบเทียบรูปแบบด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น ได้ผลดังรูปที่ 19

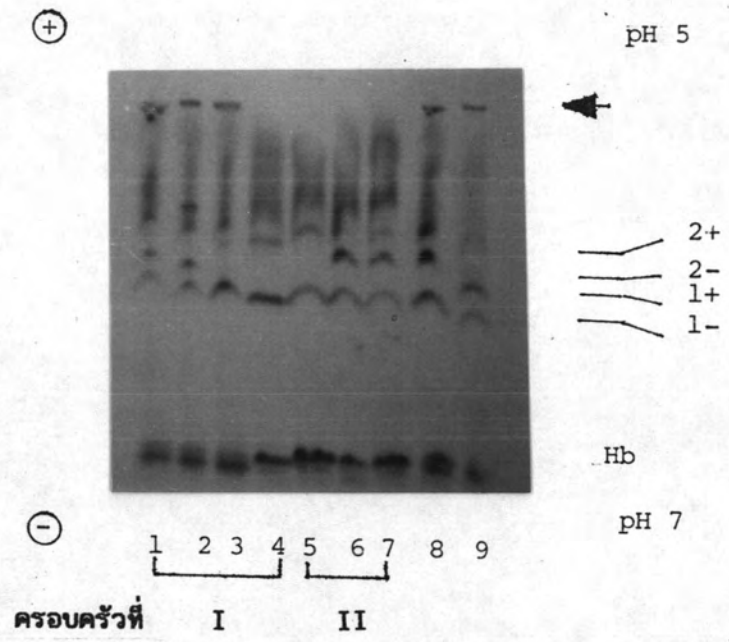


รูปที่ 19 แสดงรูปแบบของ EAP ชนิด B และ EsD ชนิด 2 ในคราบเลือด ที่อุณหภูมิต้อง
อายุ 0-27 วัน

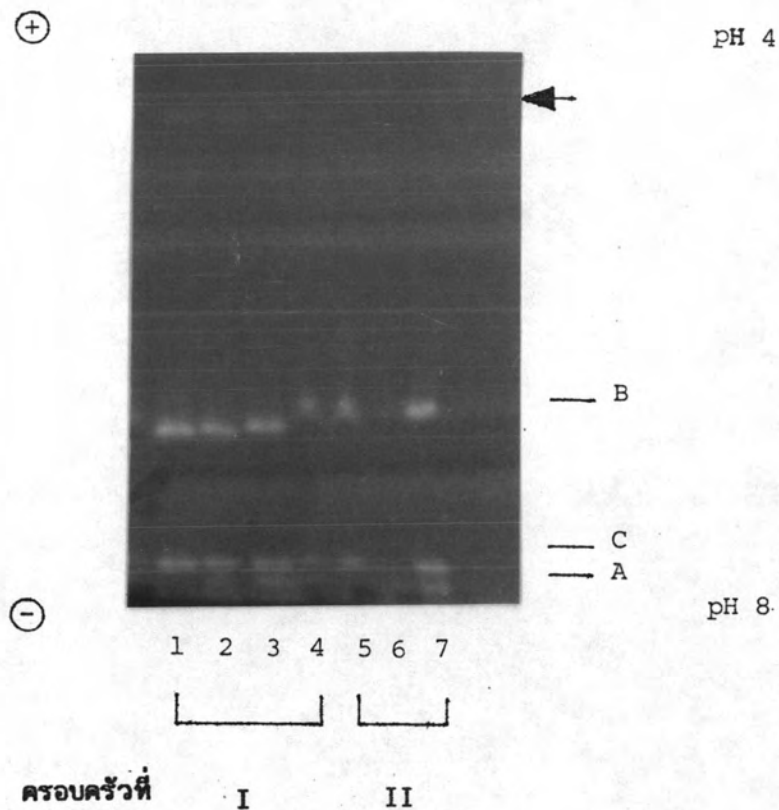
จากรูปที่ 19 แสดงถึงรูปแบบไอโซไซม์ของ EAP ชนิด B และ EsD ชนิด 2 อายุ 0-27 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าความเข้ม (intensity) ของแถบไอโซไซม์ EAP ยังคงพอให้อ่านรูปแบบได้ถึงประมาณวันที่ 21 ส่วน EsD ความเข้มของไอโซไซม์ ยังคงพอให้อ่านรูปแบบได้ถึงประมาณวันที่ 12

4.7 การศึกษารูปแบบของ PGM และ EAP ในแง่ การตรวจพิสูจน์ พ่อ - แม่ - ลูก (Paternity testing)

เนื่องจาก PGM และ EAP เป็น allozyme ซึ่งลักษณะของมันถ่ายทอดได้ด้วย พันธุกรรมดังนั้นจึงสามารถใช้ในการตรวจยืนยันหรือปฏิเสธ พ่อ - แม่ - ลูก ได้ดังรูป 20 และ 21



รูปที่ 20 การใช้รูปแบบ PGM ในการตรวจภูิเสษ พ่อ -แม่ - ลูก
 ครอบครั้ว I : 1. พ่อ (1+2-), 2.แม่ (1+2-), 3-4 ลูก (1+)
 ครอบครั้ว II : 5. พ่อ (1+), 6. แม่ (1+2+), 7. ลูก (1+2+)
 8. PGM มาตรฐาน ชนิด 1+2+
 9. PGM มาตรฐาน ชนิด 1-2-
 (<---) แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง



รูปที่ 21 การใช้รูปแบบ EAP ในการตรวจปฏิเสศ พ่อ - แม่ - ลูก

ครอบครัวที่ I : 1.พ่อ (B) , 2. แม่ (BA), 3-4 ลูก(BA)

ครอบครัวที่ II : 5.พ่อ (B), 6. แม่ (A), 7 ลูก (BA)

(<--> แสดงตำแหน่งที่ apply เลือกตัวอย่าง

จากรูปที่ 20 และ 21 อาจสรุปได้ว่า PGM และ EAP สามารถใช้เป็นแอนไซม์ปฏิเสศ

พ่อ - แม่ - ลูก ได้ด้วย

4.8 การศึกษารูปแบบการกระจายของเอนไซม์ทั้งสามในประชากรไทย

ทำการศึกษารูปแบบการกระจายของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย โดยการสุ่มจากผู้ที่มาบริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ โดยไม่จำกัดเพศและวัย จำนวน 250 ตัวอย่าง แล้วทำการจำแนกรูปแบบ PGM, EAP และ EsD ตามวิธีในข้อ 3.9.3 และ 3.11.2 ตามลำดับ จากรูปแบบ (phenotypes) ที่นับได้ (observed) นำมาคำนวณหาค่าความถี่ของการพบแต่ละ alleles (alleles frequency) ค่าการกระจายของแต่ละ phenotype ที่ควรจะเป็น (expected) และ chi-square เพื่อตรวจสอบผลที่ได้กับกฎของ Hardy-Weinberg Lab รายละเอียดปรากฏในภาคผนวก ง ได้ผลดังตารางที่ 2 (PGM), ตารางที่ 3 (EAP) และตารางที่ 4 (EsD)

ตารางที่ 2 การกระจายของ PGM₁ phenotype และ genes frequency ในประชากรไทย
จำนวน 250 ตัวอย่าง

Phenotypes	Observed		Expected *		χ^2_{**}	Genes frequency ***	
	n	%	n	%			
1+	88	35.2	88.80	35.52	0.0072		
1+1-	30	12.0	37.55	15.02	1.5180	PGM ₁ ¹⁺	0.596
1-	10	4.0	3.97	1.59	9.1589		
1+2+	64	25.6	48.28	19.31	5.1184	PGM ₁ ¹⁻	0.126
1+2-	28	11.2	34.57	13.83	1.2486		
1-2+	4	1.6	10.21	4.08	3.7771	PGM ₁ ²⁺	0.162
1-2-	9	3.6	7.31	2.92	0.3907		
2+	3	1.2	6.56	2.62	1.9319	PGM ₁ ²⁻	0.116
2+2-	7	2.8	9.39	3.76	0.2545		
2-	7	2.8	3.36	1.34	3.9433		
Total	250	100	250	99.99	27.7024		

$$\chi^2 = 27.7024, \quad df = 6$$

ค่าอิสระ (degree of freedom, df) เท่ากับค่าความแตกต่างระหว่างจำนวนของ
phenotypes และจำนวนของ alleles

*, **, *** วิธีคำนวณอยู่ในภาคผนวก ง

ตารางที่ 3 การกระจายของ EAP phenotypes และ genes frequency ของประชากรไทย
จำนวน 250 ตัวอย่าง

Phenotypes	Observed		Expected *		χ^2_{**}	Genes frequency ***
	n	%	n	%		
A	22	8.80	21.31	8.52	0.0223	A = 0.292
B	126	56.40	125.32	50.13	0.0037	B = 0.708
BA	102	40.80	103.37	41.35	0.0182	
Total	250	100	250	100	0.0442	

$$\chi^2 = 0.0442, \quad df = 1; \quad P < 0.05$$

ค่าอิสระ (degree of freedom, df) เท่ากับค่าความแตกต่างระหว่างจำนวนของ
phenotypes และจำนวนของ alleles

*, **, *** วิธีคำนวณอยู่ในภาคผนวก ง

ตารางที่ 4 การกระจายของ EsD phenotype และ genes frequency ในประชากรไทย
จำนวน 250 ตัวอย่าง

Phenotypes	Observed		Expected *		χ^2_{**}	*** genes frequency
	n	%	n	%		
1	140	56.00	118.34	47.34	3.9645	
2	45	18.00	23.41	9.36	19.9115	EsD ¹ = 0.688
2.1	62	24.80	105.26	42.10	17.7791	EsD ² = 0.306
5.1	2	0.80	2.07	0.83	0.0024	EsD ⁵ = 0.006
5.2	1	0.40	0.92	0.37	0.0069	
Total	250	100	250	100	41.6644	

$$\chi^2 = 41.6644, \text{ df} = 2$$

ค่าอิสระ (degree of freedom, df) เท่ากับค่าความแตกต่างระหว่างจำนวนของ
phenotypes และจำนวนของ alleles

*, **, *** วิธีคำนวณอยู่ในภาคผนวก ง

ตารางที่ 5 Genes frequency ของ PGM₁ จากประชากรในประเทศต่าง ๆ

ประชากร	ขนาดของ ตัวอย่าง	Genes frequency				เอกสารอ้างอิง
		PGM ₁ ¹⁺	PGM ₁ ¹⁻	PGM ₁ ²⁺	PGM ₁ ²⁻	
Indians	105	0.595	0.110	0.243	0.052	Tipler และคณะ (1982)
Japanese	156	0.615	0.083	0.234	0.067	Maneyama และคณะ (1978)
Spain	1.086	0.621	0.114	0.211	0.054	Carracedo & Concheiro (1982)
Sweden	2.135	0.614	0.164	0.156	0.066	Svensson & Wetterling (1982)
Finland	639	0.531	0.220	0.180	0.069	Matti Lukka และคณะ (1985)
Thai	250	0.596	0.126	0.162	0.116	ตารางที่ 2

ตารางที่ 6 Genes frequency ของ EAP จากประชากรในประเทศต่าง ๆ

ประชากร	ขนาดของ ตัวอย่าง	Gene frequencies			เอกสารอ้างอิง
		pA	pB	pC	
Indians	116	0.250	0.750	-	Lai & Kwa (1968)
Chinese	620	0.222	0.778	-	Lai & Kwa (1968)
Malaians	260	0.344	0.654	0.002	Lai & Kwa (1968)
Japanese	488	0.392	0.590	0.018	Shinoda Tomotaka (1967)
English	367	0.360	0.600	0.040	Hopkinson, Spencer and Harris (1963)
Austrians	410	0.365	0.573	0.062	Speiser & Pausch (1968)
Thai	250	0.292	0.708	-	ตารางที่ 3

ตารางที่ 7 Genes frequency ของ EsD จากประชากรในประเทศต่าง ๆ

ประชากร	ขนาดของ ตัวอย่าง	Genes frequency				เอกสารอ้างอิง
		EsD ¹	EsD ²	EsD ⁵	EsD ⁷	
Germans	184	0.870	0.117	0.140	-	Martin (1979)
Swiss	483	0.863	0.116	0.021	-	Bar และคณะ (1984)
Italians	510	0.845	0.136	0.019	-	Dalila และคณะ (1987)
U.S.						
Whites	3147	0.881	0.100	0.019	-	Dykes และคณะ (1982)
Blacks	247	0.913	0.085	0.002	-	Dykes และคณะ (1982)
Amerindians	118	0.792	0.208		-	Dykes และคณะ (1982)
Japanese	1823	0.628	0.364		0.008	Nishigaki & Itoh (1984)
Thai	250	0.688	0.306	0.006	-	ตารางที่ 4

จากตารางที่ 2, 3 และ 4 พบว่า gene frequency ของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทยส่วนใหญ่ คือ PGM_1^{1+} , p^B และ EsD^1 ตามลำดับ ส่วนในตารางที่ 5, 6 และ 7 แสดง genes frequency ของ PGM, EAP และ EsD จากประชากรในประเทศต่างๆ ลำดับ ซึ่งพบว่าผลการศึกษา genes frequency ของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย ให้ผลใกล้เคียงกับชนในเอเชีย (อินเดีย และญี่ปุ่น) มากกว่าชนชาวยุโรป โดยเฉพาะ EAP นั้น C phenotype จะไม่พบในชนอินเดีย, จีน และไทยเลย ส่วนในมาเลเซีย และญี่ปุ่นพบน้อยมาก เมื่อเทียบกับประเทศชาวยุโรป

จากค่า gene frequency และ phenotype frequency ของ PGM, EAP และ EsD ของประชากรไทยในตารางที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ นำไปคำนวณค่า discriminating power (DP) ของเอนไซม์ทั้งสามในประชากรไทย เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของเอนไซม์แต่ละตัว ในระบบที่พัฒนาขึ้นนี้ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 Genes frequency และ Discriminating power ของ PGM, EAP และ
EsD ในประชากรไทย

Marker	Genes frequency *	Discriminating power *
PGM	1+ = 0.596	0.79
	1- = 0.126	
	2+ = 0.162	
	2- = 0.116	
EAP	A = 0.292	0.57
	B = 0.708	
EsD	1 = 0.688	0.59
	2 = 0.306	
	5 = 0.006	
		Total 0.96 *

* วิธีคำนวณอยู่ในภาคผนวก ง

ตารางที่ 9 Discriminating power ของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย,
 คนผิว ดำ (Black) และคนผิวขาว (White) จาก Maryland.
 (Budowle , Sundaram and Wenk , 1985)

Marker	Discriminating power		
	Thai	Maryland	
		Black	White
PGM	0.79	0.71	0.73
EAP	0.57	0.52	0.67
EsD	0.59	0.22	0.43

จากตารางที่ 8 พบว่า ค่า DP ของ PGM, EAP และ EsD เท่ากับ 0.79, 0.57 และ 0.59 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่าในประชากรไทยจำนวน 100 คน โอกาสที่จะพบรูปแบบของ PGM₁, EAP และ EsD ซ้ำซ้อนกันมี 21, 43 และ 41 ตามลำดับ PGM จะมีศักยภาพสูงที่สุดในแง่ของการเป็นตัวบ่งชี้ทางนิติเวชศาสตร์สำหรับประเทศไทย ทั้งนี้เนื่องจาก PGM เป็นเอนไซม์ที่สามารถให้รูปแบบได้มากกว่า EAP และ EsD นอกจากนี้ค่า DP ของเอนไซม์ชนิดเดียวกัน (เช่น EsD) ก็อาจแตกต่างกันได้ เนื่องจากความแตกต่างของจำนวน phenotype (n) ที่ตรวจพบได้ในประชากรนั้น ถึงแม้จะใช้ระบบจำแนกเดียวกันก็ตาม ในกรณี EsD (Maryland) มีเพียง 3 phenotypes ใน Black และ 5 phenotypes ใน White

ในการจำแนกเลือดตัวอย่างสองชนิดออกจากกัน โดยใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิด เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ พบว่า ค่า DP รวมของเอนไซม์ทั้งสามจะมีค่าสูงถึง 0.96 ซึ่งสูงกว่าค่า DP ของแต่ละเอนไซม์แต่ละตัว (การคำนวณอยู่ในภาคผนวก ง)