รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การศึกษาวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์บางชนิด สำหรับงานนิติเวช

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จฬ
วท 15
007494

โดย

สุกัญญา สุนทรส

2535

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์บางชนิดสำหรับงานนิติเวช

โดย

สุกัญญา สุนทรส

กุมภาพันธ์ 2535

22 ก.ย. 2547
I 21901980

068174

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผศ. พญ. นันทนา ศิริทรัพย์ ที่ได้อนุญาตให้ใช้เครื่องมือสำหรับ horizontal gel electrophoresis และความสะดวกในการทำการทดลองบางอันที่คณะแพทย์ศาสตร์ฯ

ขอขอบคุณสภากาชาดไทยที่ให้ความสะดวกในการเก็บโลหิตตัวอย่าง และสุดท้าย - ขอขอบคุณฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้เงินทุนวิจัยรัชดาภิเษก-สมโภชสนับสนุนจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์บางชนิดสำหรับงานนิติเวช

ชื่อผู้วิจัย สุกัญญา สุนทรส

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กุมภาพันธ์ 2535

บทคัดย่อ

อิเลคโตรโฟรีซีส < Electrophoresis > เป็นวิธีการทางชีวเคมีที่สำคัญในการประยุกต์ใช้กับโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ < polymorphic enzymes > ในงานตรวจพิสูจน์บุคคล รายงานนี้มีจุดประสงค์ที่จะประเมินระบบอิเลคโตรโฟรีซีสต่างๆ ในการจำแนกชนิดของฟอสโฟกลูโคมิวเตส < phosphoglucomutase , PGM > จากโลหิตมนุษย์ โดยเปรียบเทียบผลจากระบบอิเลคโตรโฟรีซีส 4 ระบบ ดังนี้ อิเลคโตร - โฟรีซีสที่ใช้เซลลูโลสอะซิเตตเมมเบรน < Cellulose acetate membrane ,CAM > ที่ พีเอช 7.4 สามารถจำแนก PGM ออกได้เป็น 3 ชนิดย่อย คือ 2-2 , 1-1, และ 2-1 อิเลคโตรโฟรีซีสบนอะกาโรส - สตาร์ชที่พีเอชเดียวกันนี้ได้รูปแบบของชนิดย่อยเหมือนกัน แต่มีความคมชัดและความไวต่ำกว่า อิเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอคริลาไมด์เจล < polyacrylamide gel , PAGE > ชนิดระบบต่อเนื่อง ที่พีเอช 7.4 และชนิดระบบไม่ต่อเนื่องที่พีเอช 8.9 ไม่สามารถจำแนกเอนไซม์ได้เลย ไอโซอิเลค-ตริคโฟกัสซิ่ง < isoelectric focusing , IEF > บนโพลีอคริลาไมด์เจล สามารถจำแนกรูปแบบ PGM ได้ถึง 10 ชนิดย่อย คือ 1-, 1+, 1+1-, 2-, 2+, 2+2-, 1-2-, 1-2+, 1+2-, 1+2+ จึงเป็นระบบที่สามารถเพิ่มอำนาจในการแจกแจง < discriminating power > ของ PGM ได้มาก เมื่อเปรียบเทียบระบบ IEF ทั้งหมดที่ได้ทำการทดสอบพบว่า ระบบที่เคลื่อนที่ตามระนาบนอน ใช้พีเอช 5-7 และใช้ความเข้มข้นของเจล 5.3 %T มีความสามารถในการจำแนกและความไวสูงสุด รายละเอียดของแต่ละระบบปรากฏอยู่ในรายงาน

Profile Title STUDY OF SOME POLYMORPHIC ENZYMES TYPING SYSTEMS FOR FORENSIC SCIENCE

Name of the Investigator SUGANYA SOONTAROS

Year FEB. 1992

Abstract

Electrophoresis is a biochemical method for applying polymorphic enzymes utilizable for blood individualization in forensic area. The object of this report is to choose the most appropriated electrophoretic system for typing human blood phosphoglucomutase [PGM], one of the high-potential polymorphic enzymes for blood individualization. Four electrophoretic system were compared and the results were evaluated as summarized. Cellulose acetate membranye [CAM] electrophoresis at pH 7.4 could resolve PGM isozymes in to 3 subtypes namely 2-2, 1-1, and 2-1. Agarose-starch gel polyacrylamine gel at the same pH provided the same PGM pattern with relativity lower resolution and sensitivity. Polyacrylamide gel electrophoresis [PAGE] with continuous system at pH 7.4 or with discontinous system at pH 8.9 failed to resolve the enzyme. Isoelectricfocusing [IEF] on polyacrylamide gel provided the best resolution with 4 isozymes of 10 subtypes, namely 1-, 1+, 1+1-, 2-, 2+, 2+2-, 1-2-, 1-2+, 1+2-, 1+2+, thus highly increased the discriminating power of PGM. Among different IEF systems tested, horizontal system of pH 5-7 and 5.3 % T provided the best solution and sensitivity. The detial of each system is clearly reported.

สารบัญ

บทนำ	1
วิธีการวิจัย	2
วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	3
สารตัวอย่าง	5
สารละลายและการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส	5
ผลการวิจัย	14
การจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแซลลูโลสอะซิเตต	14
การจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบอะกาโรสและสตาริชเจล	15
การจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบบนโพลิอคลิลาไมด์เจล	16
การจำแนก PGM ด้วยระบบไอโซอิเลคตริกโฟกัสซิ่งที่ pH 5-7	21
การอภิปรายผล	25
ข้อสรุป	26
ข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28

เลขหมู่ ๙๙๓ อ๓ 15
เลขทะเบียน 007494
วัน.เดือน.ปี ๒๒ ก.ย. 36

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	ชื่อตาราง	หน้า
1	การจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส บนโพลีอคลิลาไมด์เจลแบบต่อเนื่อง	18

รายการภาพประกอบ

ชื่อรูป

1 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ
เซลลูโลสอะซิเตต 14

2 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบน
อะกาโรสและสตาร์ช 16

3 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบน
โพลีอคลิลาไมด์เจลแบบไม่ต่อเนื่อง 20

4 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยไอโซอิเล็กตริก
โฟกัสซิ่ง บนโพลีอคลิลาไมด์เจลที่โพลีเมอไรซ์
ด้วย 10 % แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 22

5 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยไอโซอิเล็กตริก
โฟกัสซิ่ง บนโพลีอคลิลาไมด์เจลที่โพลีเมอไรซ์
ด้วย 20 มก % ไรโบฟลาวิน 23

6 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย Isoelectric focusing
by horizontal gel ที่ pH 5-7 24

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

Polymorphic enzymes คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันในร่างกาย แต่มีลักษณะโมเลกุลแตกต่างกัน รูปแบบที่แตกต่างกันนี้อาจจำแนกได้ด้วยวิธีการทางอิเลคโตร-โฟรีซีส (electrophoresis, 1) เนื่องจากรูปแบบดังกล่าวจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกัน ดังนั้นปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาวิธีการดังกล่าวนี้ไปประยุกต์ใช้กับงานต่างๆมากมาย เช่นการจัดหมวดหมู่ (taxonomy) ของแบคทีเรีย (2) ของพืช และการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมในหมู่ประชากร (population genetics,3) ตลอดจนถึงใช้ช่วยในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ (4) ในคน

เมื่อพิจารณาโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ พบว่ามีเอนไซม์หลายชนิดที่รูปแบบของมันแตกต่างกันในบุคคล ทั้งยังสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรม และมีลักษณะการกระจายตัวของรูปแบบในกลุ่มประชากรต่าง ๆที่แตกต่างกัน จึงมีผู้นำเอาวิธีการจำแนกโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสมาใช้ช่วยในงานนิติเวชอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ (1) โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบของเอนไซม์ดังกล่าวจากวัตถุพยาน เช่น คราบโลหิตในที่เกิดเหตุ กับโลหิตของผู้ต้องหา ทั้งเพื่อยืนยันตัวผู้กระทำผิดหรือยืนยันความบริสุทธิ์ของผู้ถูกกล่าวหา อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ในงานด้านนี้ในประเทศไทยยังมีน้อยมาก ทั้งนี้ด้วยสาเหตุใหญ่ 2 ประการ คือ

1. ยังขาดข้อมูลพื้นฐานที่จำเพาะสำหรับประเทศไทยเอง ได้แก่ ลักษณะการกระจายของรูปแบบเอนไซม์ในหมู่ประชากรซึ่งจะเป็นตัวกำหนดอำนาจการแจกแจง (discrimination power) ของเอนไซม์แต่ละชนิด และความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทยเองอันจะเป็นตัวระบุชนิดและศักยภาพของเอนไซม์ที่จะใช้งาน

2. Electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีการทางชีวเคมีที่ใช้แยกโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์มีหลายชนิด เช่น แบบ cellulose acetate แบบ agarose แบบ polyacrylamide gel แบบ starch ตลอดจนถึงแบบ isoelectric focusing polyacrylamide แต่ละ-แบบมีข้อดีและข้อด้อยที่แตกต่างกันสำหรับโปรตีนและเอนไซม์แต่ละชนิด ยังไม่มีผู้ที่ทดลองหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ที่เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ในงานนิติเวชของประเทศเรา

ในการค้นคว้าเบื้องต้น พบว่ามีเอนไซม์ในโลหิตมนุษย์ที่มีลักษณะเป็นโพลีมอร์ฟิค และมีผู้นิยมนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ในงานนิติเวชในต่างประเทศประมาณ 10 ชนิด และเมื่อเพิ่มจำนวนชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ อำนาจในการแจกแจงของระบบก็จะสูงขึ้น แต่เนื่องจากโครงการ

ฉบับนี้เป็นเพียงงานวิจัยเบื้องต้นจึงกำหนดขอบเขตของงานวิจัยนี้โดยการศึกษาจากเอนไซม์ 2 ชนิด โดยเลือกเอนไซม์ที่มีหลักฐานกล่าวอ้างว่ามีศักยภาพสูงก่อน อันได้แก่ ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucomutase, PGM) และ แอซิดฟอสฟาเตส (erythrocyte-acid phosphatase , EAP)

การสร้าง PGM ถูกควบคุมด้วย gene 4 loci ด้วยกัน คือ PGM_1, PGM_2, PGM_3, และ PGM_4 เฉพาะ PGM_1 เท่านั้น ที่มีความเป็นโพลีมอร์ฟิคสูงที่สุด จึงมีความสำคัญทางนิติเวชสูงกว่า loci อื่น ๆ เทคนิค cellulose acetate electrophoresis ซึ่งเป็นเทคนิคแต่เดิมที่ใช้ในการจำแนก phenotype ของ PGM สามารถจำแนกเอนไซม์ออกได้เป็น 3 ประเภท คือ PGM_1, PGM_2, PGM_{2-1} จนกระทั่งปี 1976 Bark และคณะ(5) ได้แสดงให้เห็นว่า PGM_1 ประกอบด้วย common alleles ถึง 4 ชุด คือPGM_1^{1+}, PGM_1^{1-}, PGM_1^{2+}, PGM_1^{2-} ดังนั้นจำนวน phenotype จึงควรมีมากกว่า 3 ชนิด ดังที่เคยทราบมา

Cellulose acetate electrophoresis ซึ่งเคยใช้กันอย่างแพร่หลายในเวลาที่ผ่านมา อาจไม่มีความสามารถสูงพอที่จะจำแนก phenotype ของเอนไซม์ทั้งสองได้แล้ว การพัฒนาระบบอิเลคโตรโฟรีซีสที่มีอำนาจการจำแนกสูงจึงมีความสำคัญเท่า ๆกับความเป็นโพลีมอร์ฟิคของเอนไซม์เหมือนกัน

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงอีกอันหนึ่งก็คือ ความเสถียรของเอนไซม์ เอนไซม์เป็นโปรตีนสมบัติอันหนึ่งที่จำกัดความสามารถของมันในการนำมาใช้งานก็คือ ความเสถียร เอนไซม์ส่วนมากเสียสภาพเมื่อถูกความร้อน ถูกสลายได้ด้วย proteolytic enzyme จากแบคทีเรียหรือรา เอนไซม์อีกจำนวนหนึ่งที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้ดีมาก เอนไซม์ประเภทหลังนี้เองที่มีศักยภาพสูงในงานด้านนิติเวช เนื่องจากบ่อยครั้งที่วัตถุพยานในที่เกิดเหตุมักถูกพบเมื่อเวลาผ่านไปนานมาก ยังไม่มีผู้ใดทำการทดลองหาความเสถียรของ PGM และ EAP ในสภาวะแวดล้อมทั่วไปของประเทศไทย ดังนั้น วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือ การหาวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสม เพื่อสามารถนำโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์นั้นๆมาใช้ในการตรวจระบุบุคคลในงานนิติเวช

วิธีการวิจัย

เลือกเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีสที่เหมาะสมที่สุด ในการจำแนกรูปแบบของ PGM บนตัวค้ำจุนชนิดต่างๆ คือ แป้ง (starch) , เซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate), อะกาโรส (agarose), โพลีอคริลาไมด์

(polyacrylamide) และไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่งบนโพลีอคริลาไมด์

(isoelectric focusing on polyacrylamide)

วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์

สำหรับเซลลูโลสอะซิเตตอิเลคโตรโฟรีซีส

ของบริษัท HELENA

model No 1283, serial No 16138

membrane - สำหรับ PGM; TITAN III ISO - VIS

สำหรับโพลีอคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

ของบริษัท เบคไทยกรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด

- LKB 2050 Midget Electrophoresis Unit
- LKB 2197 Power Supply
- LKB 2219 Multitemp II Thermostatic Circulater

สำหรับไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง

ของบริษัท เบคไทยกรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด

- LKB 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit
- LKB 2050 Midget Electrophoresis Unit

สารเคมี

จากบริษัท BDH

- Hydrochloric acid
- Riboflavin
- N N N′N′- Tetramethyl -1,2- diaminoethane (TEMED)

จากบริษัท DIFCO

- Noble agar

จากบริษัท EKA NOBEL

- Sodium hydroxide

จากบริษัท FLUKA

- Ethylene diamine tetraacetic acid < EDTA >
- $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
- Tris - hydroxy - methylaminomethane

จากบริษัท MERCK

- Acrylamide
- Ammonium persulfate
- Acetic acid
- Phosphoric acid
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- NaH_2PO_4

จากบริษัท SERI

- ES agarose

จากบริษัท SIGMA

- Bis-acrylamide
- EPPS
- Glycine
- Glucose-6-phosphate dehydrogenase
- α-D-Glucose-1-phosphate with 1% Glucose 1,6 diphosphate
- Maleic acid
- β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate < NADP >
- β-<4,5-Dimethylthiazol-2-yl> -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide < MTT >
- Phenazine methosulfate < PMS >
- Trizma base

พจนานุกรม สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารตัวอย่าง

เม็ดเลือดแดง

โลหิตสดที่นำใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์บริการ-โลหิตของสภากาชาดไทย และได้ผ่านการตรวจสอบ anti HIV แล้ว

นำโลหิตสดปริมาตร 10 มล. มาเซ็นตริฟิวส์เก็บเม็ดเลือดแดงที่ 7,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงนี้ไปปั่นล้างด้วย 0.9% normal saline ปริมาตร 5 มล. ที่ 7,000 รอบต่อนาที 3 ครั้งๆละ 10 นาที ถ้ายังไม่ใช้ในทันที เก็บเม็ดเลือดแดงไว้ที่ -20° ซ. ก่อนใช้ทำเม็ดเลือดแดงให้แตก < 6 > โดยสกัดด้วยน้ำกลั่น หรือ 0.05 M. dithiothireol < DTT > แล้วนำไปแยกด้วยอิเลคโตรโฟรีซีส

คราบเลือด

นำโลหิตสดหยดลงบนผ้าฝ้ายขนาด 4 x 4 ซม. ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ถ้ายังไม่ใช้ในทันที เก็บไว้ที่ 4° ซ. ก่อนใช้นำมาสกัดคราบเลือด โดยตัดคราบเลือดขนาด 0.5 x 0.5 ซม.^{2} แล้วสกัดด้วยน้ำกลั่นหรือสารละลาย 0.05 M. - dithiothireol < DTT > < 6 > เพื่อทำเม็ดเลือดแดงให้แตก

สารละลายและการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

เซลลูโลสอะซิเตต

บัฟเฟอร์สำหรับการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

0.1 M. Tris - maleic , pH 7.4

Tris	12.11	กรัม
Maleic acid	11.62	กรัม
EDTA	2.92	กรัม
$MgCl_2 . 6H_2O$	2.03	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 700 มล. ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บไว้ที่ 4° ซ. เมื่อจะใช้เจือจาง 15 เท่าด้วยน้ำกลั่น เพื่อใช้สำหรับบรรจุในอ่างทำอิเลคโตรโฟรีซีส <tank buffer > และทำให้แผ่นเซลลูโลสอิ่มตัว < membrane buffer >

การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตของ HELENA LABORATORIES ISO-VIS มาแช่ใน membrane buffer นาน 20 นาที เติม tank buffer ลงในแชมเบอร์ วางกระดาษกรองลงบนผนังกั้นระหว่างขั้วบวกและลบ เพื่อเป็นสะพานไฟ นำเมมเบรนที่ equilibrate แล้ว มาซับด้วยกระดาษกรอง No 1 วางลงบนเพลทสำหรับหยอดสาร-ตัวอย่าง กดแอพพลิเคเตอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่าง 1 ครั้ง รีบนำไป apply ลงบนแผ่นเมมเบรนค่อนข้างมาทางขั้วลบเล็กน้อย ควำ่เมมเบรนด้านที่หยดสารตัวอย่างลงบนผนังกั้นให้สัมผัสกับแผ่นกระดาษกรองที่เป็นสะพานไฟอย่างสำ่เสมอ และไม่เอียง (อาจใช้กระจกสไลด์วางทับด้านปลายของเมมเบรน เพื่อให้สนิทยิ่งขึ้น) ใช้ปากกาเขียนขั้วไว้บนด้านหลังของเมมเบรน ปิดฝาครอบ เสียบสายไฟ เปิด power supply ปรับความต่างศักย์ไปที่ 250 โวลต์ ที่ 4° ซ. และเวลาตามต้องการ

อะกาโรสและสตาร์ชเจล

บัฟเฟอร์สำหรับการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

ใช้ 0.1 M. Tris - maleic , pH 7.4 เหมือนการทำอิเลคโตรโฟ-รีซีสบนเซลลูโลอะซิเตต

การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

เตรียม 2% ES agarose gel หรือ สารผสมระหว่าง agarose และ starch ในปริมาณอย่างละ 1% แล้วเทลงบนแผ่นกระจกขนาด 12.5 x 26 ซม. ให้มีความหนาประมาณ 0.1 ซม. รอให้เจลแข็งใช้ cotton threads ขนาดยาว 1 ซม. จุ่มในสารตัวอย่าง แล้ววางบนเจล ให้ห่างจากขั้วลบ <cathode > ประมาณ 2.5 ซม. ใช้ผ้าสำลีเป็นสะพานไฟ โดยให้ปลายผ้าสำลีจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์ทั้งสองข้าง เสียบสายไฟ เปิด power supply ปรับความต่างศักย์คงที่ที่ 250 โวลต์ < 89 มิลลิแอมป์ >, นาน 2 ชม. 30 นาที , ที่ 4° ซ.

โพลีอคริลาไมด์เจล

โพลีอคริลาไมด์แบบต่อเนื่อง < Continuous Polyacrylamide gel >

บัฟเฟอร์สำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซีส

Electrode buffer และ Gel buffer

ใช้ 0.02 M. tris - maleic , pH 7.4 โดยนำบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการทำอิเลคโตรโฟรีซีสบนเซลลูโลสอะซิเตท มาเจือจาง 5 เท่า

Sample buffer

0.05 DTT ใน 0.01 M. Tris - maleic , pH 7.4

การเตรียม 7.5 % เจล

30% Acrylamide solution	6.25	มล.
Gel buffer , pH 7.4	3.13	มล.
น้ำกลั่น	15.42	มล.
10% Ammonium persulfate	0.21	มล.
TEMED	42.25	ไมโครลิตร

การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

เทเจลลงในระหว่างแผ่นกระจกและอลูมิเนียมออกไซด์ < Aluminium oxide > ขนาด 8 x 10 ซม. เจลจะแข็งตัวภายใน 45 นาที พร้อมที่จะนำไปใช้ ก่อนใช้นำไป pre-run ที่ 40 มิลลิแอมป์ , 4° ซ. เป็นเวลา 1 ชม. 30 นาที แล้วเปลี่ยนบัฟเฟอร์ก่อน 1 ครั้ง ใส่สารตัวอย่างที่เตรียมไว้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในเจล แล้วเปิดกระแสไฟ โดยให้กระแสคงที่ และขนาดเท่ากับเมื่อ pre-run ติดตามผลโดยการย้อมสีโปรตีน และแอคติวิตี้ของ PGM

โพลีอคริลาไมด์แบบไม่ต่อเนื่อง (Discontinuous Polyacrylamide gel)

บัฟเฟอร์และสารละลายสำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซีส

Tris-glycine electrode buffer , pH 8.3

Tris	6.0	กรัม
Glycine	28.8	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH ให้เป็น 8.3 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

Tris-chloride buffer stock solution, pH 8.9

Tris	36.6	กรัม
TEMED	0.23	มล.
6 N HCl	15	มล.
น้ำกลั่น	25	มล.

ปรับ pH ให้เป็น 8.9 ด้วย 6N HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

Tris-chloride buffer solution , pH 6.7

Tris	5.98	มล.
TEMED	0.46	มล.
1 N HCl	48	มล.

ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ปรับ pH ให้เป็น 6.7 ด้วย 1N HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

30% Acrylamide solution

Acrylamide	29.1	กรัม
Bis-acrylamide	0.9	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.

10% Ammonium persulfate

0.1 กรัม Ammonium persulfate ละลายในน้ำกลั่น 1 มล.

Working gel solution

Ingredient < ml >	separating gel < 20 ml >					stack -ing gel
	%T					
	5.0	7.5	10.0	12.0	15.0	4.5
30% Acrylamide solution	3.33	5.00	6.70	8.00	10.00	2.80
Tris-HCl stock sol^{n}.,pH8.9	2.53	2.53	2.53	2.53	2.53	_
Tris-HCl stock sol^{n}.,pH6.7	-	-	-	-	-	2.53
น้ำกลั่น	13.87	12.30	10.70	9.40	7.30	12.70
10%Ammonium persulfate	0.20	0.17	0.17	0.15	0.15	0.40

การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

เท separating gel ลงในระหว่างแผ่นกระจกและอลูมิเนียม-ออกไซด์ขนาด 8 x 10 ซม. ปล่อยให้เจลแข็ง (ประมาณ 30 นาที) แล้วเท stacking gel ลงเหนือ separating gel เจลจะแข็งตัวภายใน 45 นาที พร้อมที่จะนำไปใช้

หลังจากใส่สารตัวอย่างที่ผ่านขบวนการใน 3.2 ลงในเจลตัวอย่าง ละ 10 ไมโครลิตร แล้วเปิดกระแสไฟ โดยให้กระแสคงที่ที่ 40 มิลลิแอมป์ , 4° ซ. เป็นเวลาประมาณ 2 ชม. แล้วนำเจลนั้นไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM

ไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง ที่ pH 5-7

Isoelectric focusing by Vertical Midget electrophoresis

บัฟเฟอร์และสารละลายสำหรับทำไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง

Electrolyte

Cathode : 0.20 M. NaOH

Anode : 0.05 M. H_3PO_4

Working gel solution < สำหรับ 2 เจล , 14 มล.>

สูตร I < 5.3% T > ความหนาของเจลเท่ากับ 0.50 มม.

30% Acrylamide solution	2.45	มล.
1% Bis-acrylamide	3.50	มล.
Ampholine , pH 5-7	0.67	มล.
น้ำกลั่น	3.89	มล.
50 g% Sucrose	3.32	มล.
0.2 M. Ammonium persulfate	0.11	มล.

สูตร II < 5.5%, 6%, 7%T > ความหนาเจลเท่ากับ 0.75 มม.

Ingredient < ml >	%T		
	5.5	6.0	7.0
30% Acrylamide solution	3.66	4.00	4.66
น้ำกลั่น	14.00	13.66	13.00
Ampholine , pH 5-7	2.2	2.2	2.2
EPPS	0.26	0.26	0.26
20 mg% Riboflavine (ไมโครลิตร)	200	200	200
TEMED (ไมโครลิตร)	15	15	15

การทำไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง

เทเจลส่วนผสมตามสูตร I หรือ II ลงในระหว่างแผ่นกระจกและแผ่นอลูมิเนียมออกไซด์ขนาด 8 x 10 ซม. เจลจะแข็งตัวภายใน 45 นาที พร้อมที่จะนำไปใช้ หลังจากนั้นใส่สารตัวอย่างที่ผ่านขบวนการใน 3.2 ลงในเจลตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า โดยให้กำลังคงที่ที่ 30 วัตต์

Isoelectric focusing by Horizontal chamber

บัฟเฟอร์และสารละลายสำหรับทำไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง

Electrolyte

Cathode : 1% Ethanolamine

Anode : 1% Acetic acid

Working gel solution (ต่อ 1 เจล)

30% Acrylamide solution	1.25	มล.
1% Bis-acrylamide	1.75	มล.
Ampholine , pH 5-7	0.34	มล.
น้ำกลั่น	1.95	มล.
50 g% Sucrose	1.66	มล.
0.2 M. Ammonium persulfate	55	ไมโครลิตร

การทำไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง

เทเจลส่วนผสมดังกล่าว ลงในระหว่างแผ่นกระจกขนาด 15 x 20 ซม. เจลจะแข็งตัวภายใน 45 นาที หลังจากนั้นแกะแผ่นกระจกแผ่นบนออก apply sample โดยใช้กระดาษกรองขนาด 4 x 4 มม.^{2} จุ่มลงในสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ ให้ชุ่มพอดี จากนั้นนำไปวางบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ให้ห่างจากขั้วบวกประมาณ 4 ซม. โดยใน 1 แผ่นเจล จะสามารถใช้แยกสารตัวอย่างได้ประมาณ 20 ตัวอย่าง แล้วนำแผ่นเจลนี้ไปวางบน cooling plate ของ Horizontal chamber ที่ 4° ซ. ใช้electrode wicks จุ่มใน 1% Acetic acid ไปวางบนเจลทางปลายด้านขั้วบวก และจุ่มใน 1% Ethanolamine ไปวางบนเจลทางปลายด้านขั้วลบ ปิดฝาให้อิเลคโทรดทับ electrode wicks ให้สนิท เปิดกระแสไฟฟ้า ให้ความต่างศักย์คงที่ที่ 2,000 โวลต์,กำลังไฟ 10 วัตต์ , กระแส 8 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 2 ชม. 30 นาที แล้วนำเจลนั้นไปย้อมดูแอคติวิตี้ของ PGM

การย้อมสีโปรตีน

Staining และ Destaining solution

1. Staining concentrate : ละลาย Coomassie blue R 0.25 กรัม ใน 95% Ethanol ปริมาตร 100 มล. คนประมาณ 1 ชม. กรองแล้วเก็บไว้

2. 5% และ 10% Acetic acid อย่างละ 1 ลิตร

นำเจลที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสใส่ในกล่องบรรจุสีที่เตรียมไว้ แล้วย้อมสีตามขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 สารผสมระหว่าง 10% Acetic acid และ Stain - concentrate ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งไว้ข้ามคืน

ขั้นที่ 2 สารผสมระหว่าง 95% ethanol และ 5% Acetic acid ในอัตราส่วน 2:3 ตั้งไว้ 1 ชม.

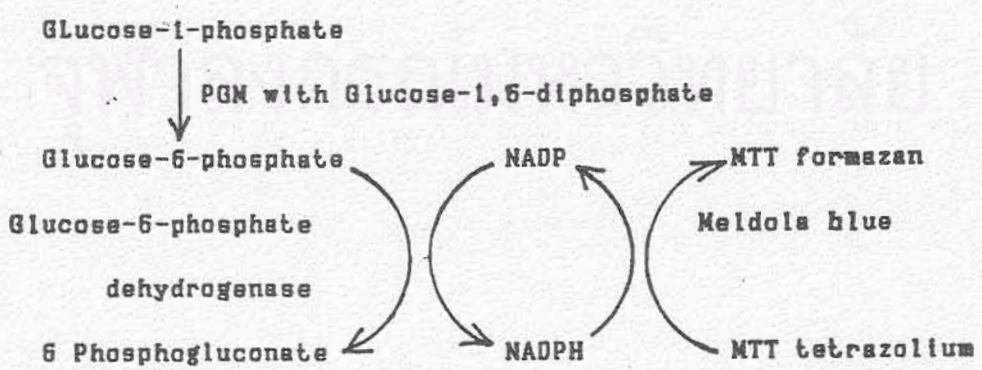
ขั้นที่ 3 สารผสมระหว่าง 95% ethanol และ 5% Acetic acid ในอัตราส่วน 3:7 ตั้งไว้ 30 นาที

ขั้นที่ 4 เหมือนขั้นที่ 3

ขั้นที่ 5 สารผสมระหว่าง 95% ethanol และ 5% Acetic acid ในอัตราส่วน 1:4 ตั้งไว้ 30 นาที

ขั้นที่ 6 แช่เจลไว้ในสารผสมระหว่าง 5% Acetic acid และน้ำ ในอัตราส่วน7:3

การติดตามแอคติวิตี้ของ PGM โดยมีหลักการดังนี้ <7>



สารละลาย < Reaction buffer >

Trizma base	1.2	กรัม
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.4	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 70 มล. ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

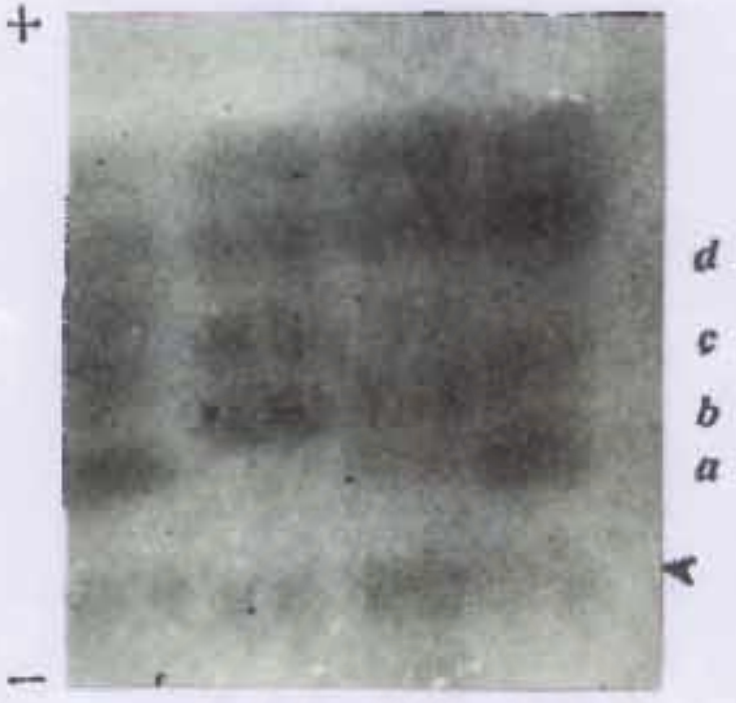
Reaction mixture

1. 2% Noble agar in H_2O	15	มล.
2. G-1-P+1%G-1,6- di P	35	มก.
3. NADP	2	มก.
4. MTT	3	มก.
5. G-6-P dehydrogenase < 1 unit >	3	ไมโครลิตร
6. MLB (0.5 มก./มล.)	0.2	มล.
7. Reaction buffer	10	มล.

โดยผสมสารในข้อ 2-7 ให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้าตู้อบที่ 37° ซ. เป็นเวลา 10 นาที ก่อนใช้ผสม 2% Noble agar ที่ละลายแล้ว และอุณหภูมิไม่เกิน 50° ซ. ให้เข้ากันดี เทสารผสมทั้งหมดลงบนตัวค้ำจุนของอิเลคโตรโฟรีซีส หรือไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง เมื่อวุ้นแข็ง อินคิวเบตไว้กับตัวค้ำจุนที่ 37° ซ. เป็นเวลา 45-60 นาที เก็บผลโดยการถ่ายรูป

ผลการวิจัย

1. การจำแนก PGM ด้วย อิเลคโตรโฟรีซีสแบบ เซลลูโลสอะซิเตท



PGM_1 type	1-1	2-2	2-1	2-1

รูปที่ 1 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย อิเลคโตรโฟรีซีสแบบ เซลลูโลสอะซิเตท ที่ pH 7.4 และติดสาย PGM ด้วย activity stain

➤ แสดงตำแหน่งที่ apply เลือดตัวอย่าง

จากรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่า การทำอิเลคโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท โดยใช้ 0.1 M. Tris-maleic , pH 7.4 สามารถที่จะจำแนก PGM ออกเป็น 3 รูปแบบ คือ 1-1 , 2-2 , และ 2-1 อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้เหมาะที่จะใช้กับงานที่รีบด่วน เพราะใช้เวลาในการทำอิเลคโตรโฟรีซีสเพียง 45 นาที เท่านั้น แต่จำนวนรูปแบบเพียง 3 รูปแบบระบุว่าเทคนิคนี้ยังมีอำนาจการแจกแจงต่ำ ควรพัฒนาระบบจำแนกให้ดีกว่านี้ เมื่อใช้ในงานที่ต้องการความละเอียดที่มากขึ้น

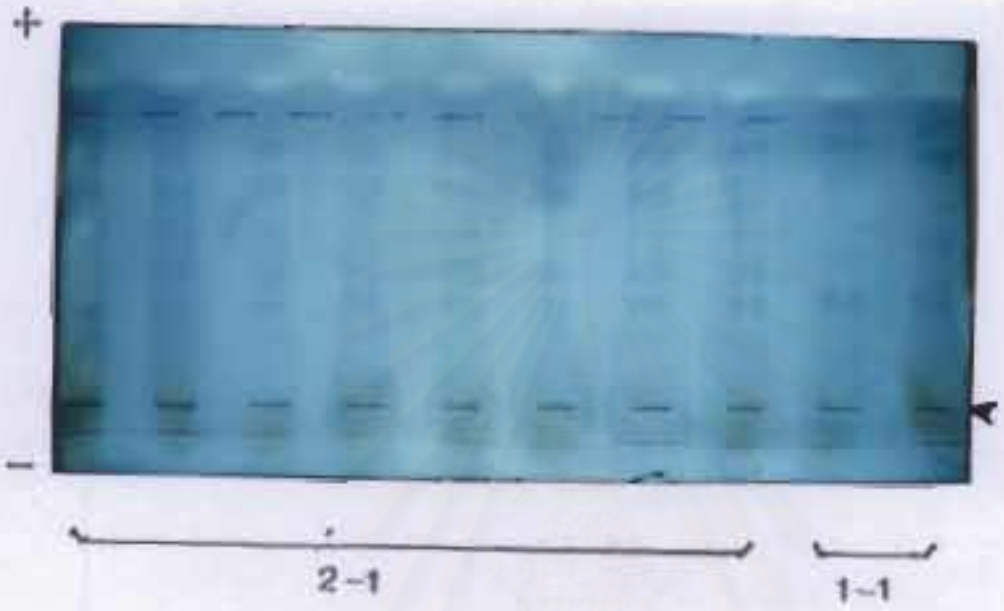
2. การจำแนก PGM ด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสแบบอะกาโรสและสตาร์ชเจล

ผู้ทำการทดลองได้พิจารณาเห็นว่า ปัจจัยที่จะเพิ่มความสามารถของอิเลคโตรโฟรีซีสให้มีอำนาจแจกแจงสูงขึ้น คือ ชนิดของตัวกลางที่ใช้เป็นตัวค้ำจุน จึงเปลี่ยนจากเซลลูโลสอะซิเตตมาเป็นอะกาโรส โดยคงระบบบัฟเฟอร์ไว้เช่นเดิม

ในขั้นต้นของการทดลองได้ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2% พบว่าแถบสีที่ได้จากการติดตามแอคติวิตี้ โดยวิธีเดียวกับที่ทำเซลลูโลสอะซิเตต มีลักษณะจางและกว้างกว่าเดิมมาก จึงทำให้ประสิทธิภาพในการจำแนกรูปแบบเอนไซม์ต่ำลงมาก จากการสังเกตลักษณะของอะกาโรสในขณะทำอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าเนื้ออะกาโรสทางขั้วบวกแห้งมาก ทั้งนี้คาดว่า เนื่องจากอะกาโรสที่ใช้มีค่าอิเลคโตรเอนดอสโมซีส < electroendosmosis, EEO > สูงเกินไป อย่างไรก็ตามเมื่อเปลี่ยนไปใช้อะกาโรสที่มีค่า EEO ต่ำลง จนถึงน้อยกว่า 0.10 ผลของการทดลองยังไม่ดีขึ้น

จากผลดังกล่าวจึงเปลี่ยนไปใช้สารผสมระหว่างอะกาโรสและสตาร์ชในปริมาณอย่างละ 1% ได้ผลดีขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2 คือ เกิดการแยกของไอโซไซม์ใน PGM ทั้ง 3 รูปแบบ แต่ลักษณะแถบสีที่ได้ยังมีความกว้างไม่คมชัด จนอาจเกิดการเกยทับ < overlapping > ของแถบไอโซไซม์

068174



รูปที่ 2 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเลคโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสแผ่นสตาร์ช ความเข้มข้นอย่างละ 1% ใน 0.1 M. Tris-maleic , pH 7.4 และย้อมสี PGM ด้วย activity stain

3.การจำแนก PGM ด้วยอิเลคโตรโฟรีซิสบนโพลิอคริลาไมด์เจล

จากการทดลองในข้อ 2 แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนตัวกลางของอะกาโรสแผ่นสตาร์ชไปเป็นตัวกลางที่มีรูพรุน และสามารถทำให้เกิด sieving effect ได้มากขึ้น เนื่องกันการแพร่กระจายของโมเลกุลของไอโซไซม์ อันจะทำให้แถบสีที่ได้มีความชัดเจน ไม่เกิดการเกยทับของไอโซไซม์ต่อไปจึงได้เลือกใช้โพลิอคริลาไมด์

3.1 การจำแนก PGM ด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอคริลาไมด์เจล ประเภทต่อเนื่อง < Continous > ที่ , pH 7.4

เนื่องจากยังไม่มีระบบอิเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอคริลาไมด์เจลที่ pH 7.4 ที่เหมาะสมมาก่อน และระบบนี้เป็นระบบที่มีความต้านทานไฟฟ้าสูงกว่าระบบที่ผ่านมา ผู้วิจัยจึงได้ทดลองทำอิเลคโตรโฟรีซีสโดยใช้โพลีอคริลาไมด์ที่มี %T เท่ากับ 7.5 ทดลองแปรความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนในขณะทำอิเลคโตรโฟรีซีสด้วยฮีโมโกลบินในสารตัวอย่าง และติดตามอำนาจในการจำแนก PGM ของระบบด้วยการย้อมสีโปรตีนและย้อมแอคติวิตี้ของ PGM

ตารางที่ 1 การจำแนก PGM ด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอคริลาไมด์เจลแบบต่อเนื่องที่ pH 7.4 ใช้โพลีอคริลาไมด์ที่ %T = 7.5 แปรความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ดังระบุในตาราง pre-run เป็นเวลา 1 ชม. 30 นาที ที่ 4° ซ. ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 40 มิลลิแอมป์ หลัง pre-run เปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่ แล้วให้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 40 มิลลิแอมป์ รอจนฮีโมโกลบินเคลื่อนที่ไปจนตกเจลด้านแคทโทด จึงหยุดการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

สภาวะที่	ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์		ความต่างศักย์(โวลต์)		เวลา นาที	ผลการทดลอง	
	อิเลคโทรด	ในเจล	เริ่มต้น	สิ้นสุด		โปรตีน	PGM
1	X	X/10	15	15	135	ไม่เคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่
2	X/2	X/2	26	30	180	ไม่เคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่
3	X/4	X/4	56	53	120	เคลื่อนที่ไป 1 ใน 3 ของระยะทาง resolution ต่ำมาก	เคลื่อนที่ไป 1 ใน 3 ของระยะทาง resolution ต่ำมาก
4	X/10	X/10	100	107	180	- ###	เคลื่อนที่ไป 1 ใน 5 ของระยะทาง resolution ต่ำมาก

X คือ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เท่ากับ 0.2 M. Tris, 0.2 M. maleic acid, 0.02 M. EDTA, 0.02 M. $MgCl_2$, pH 7.4

เมื่อสิ้นสุดการ run , pH ของบัฟเฟอร์สำหรับอิเลคโทรด เปลี่ยนเป็น 10.1

จากการทดลองที่ผ่านมาแล้วทั้งสองระบบ เห็นได้ว่าอิเลคโตรโฟรีซีสสามารถจำแนก PGM ได้แล้ว แต่ยังไม่ดีนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงยึดแนวทางปฏิบัติที่จะเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ให้น้อยที่สุด โดยเปลี่ยนเฉพาะชนิดของตัวกลางเท่านั้น และสภาวะที่ต้องรักษาให้คงที่อีกอันหนึ่ง คือปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบ เพราะการเพิ่มปริมาณไฟฟ้าเป็นการเพิ่มความร้อนให้แก่ระบบด้วย ตามความสัมพันธ์

$$H = I^2R$$

โดยที่ H = ความร้อน

I = กระแสไฟฟ้า

R = ความต้านทานของระบบ

จากตารางที่ 1 ชี้ให้เห็นว่า (สภาวะที่ 1) เมื่อให้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในเจลและในอิเลคโทรดเท่ากันกับสองระบบที่เคยใช้ได้ผลมาแล้ว กลับพบว่าความต่างศักย์ที่เกิดในระบบนี้ต่ำมาก (15 โวลต์) ต่ำเกินไปที่จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโปรตีนและ PGM ได้ อาจอธิบายได้ว่า เพราะระบบโพลีอคริลาไมด์มีความต้านทานสูงมาก การทดลองในสภาวะต่อไป เมื่อเพิ่มศักดาไฟฟ้าให้แก่ระบบ ได้ลดความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ลงตามลำดับ พบว่าสภาวะที่ 3 สามารถทำให้โปรตีนและ PGM เคลื่อนที่ไปได้ 1 ใน 3 และ 1 ใน 5 ของระยะทางทั้งหมดตามลำดับแต่ยังเป็นระยะทางที่สั้นเกินกว่าจะจำแนกไอโซไซม์ของ PGM ออกจากกันได้

สภาวะที่ 4 ให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็นที่น่าพอใจที่สุด PGM เคลื่อนไปในระยะทางเท่าเดิม แต่มีปัญหาที่ทำให้ไม่สามารถพัฒนาระบบได้ต่อไป คือ บัฟเฟอร์ไม่สามารถควบคุม pH ได้ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง pH ของบัฟเฟอร์ในสารละลายอิเลคโทรดเปลี่ยนไปถึง 2.7 หน่วย (ไปเป็น 10.1)

3.2 การจำแนก PGM ด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอคริลาไมด์เจลแบบไม่ต่อเนื่อง < Discontinuous > ที่ pH 8.9

ถึงแม้การทดลองด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอคริลาไมด์เจลแบบต่อเนื่อง จะไม่ให้ผลที่ดีนัก แต่จากการสังเกตการเคลื่อนตัวของฮีโมโกลบิน ในตัวอย่างระหว่างการทำอิเลคโตรโฟรีซีส ทำให้สรุปได้ว่า ถึงแม้จะใช้สารตัวอย่างในปริมาณต่ำถึง 10 ไมโครลิตรแล้วก็ตาม อำนาจในการแจกแจง PGM รวมทั้งโปรตีนอื่นๆก็ยังต่ำอยู่มาก

หากไม่มีระบบที่ลดปริมาตรสารตัวอย่างเสียก่อน ดังนั้นโพลีอคริลาไมด์เจลแบบไม่ต่อเนื่องน่าจะเป็นระบบที่เหมาะกว่าแบบต่อเนื่อง ในการทดลองนี้จึงทำการทดลองจำแนก PGM ด้วยอิเลคโตรโฟรีซิสบนโพลีอคริลาไมด์เจลแบบไม่ต่อเนื่องที่ pH 8.9 โดยแปรความเข้มข้นของโพลีอคริลาไมด์ (7.5%T, 10%T และ gradient concentration 5-15%T, 5-12%T และ 7-12%T) ได้ผลคือ PGM สามารถแยกออกจากกันได้บ้างแต่ยังไม่ชัดเจน ความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดคือ 10%T ดังแสดงในรูปที่ 3
และ เมื่อเทียบกับผลของเซลลูโลสอะซิเตทหรืออกาโรสเจลนับว่ายังเลวกว่า นอกจากนี้ยังมีปัญหาตามมาคือ เมื่อระยะเวลาในการ run ผ่านไปความต่างศักย์จะเพิ่มสูงขึ้นมากจนไม่สามารถควบคุมความต่างศักย์นี้ได้

รูปที่ 3 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเลคโตรโฟรีซิสบนโพลีอคริลาไมด์-เจลแบบไม่ต่อเนื่อง (Discontinuous polyacrylamide gel) ที่ pH 8.9 ที่ 10%T และติดสี PGM ด้วย activity stain

พลมุลกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การจำแนก PGM ด้วย ระบบไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิ่งที่ pH 5-7

4.1 Isoelectric focusing by Vertical Midget electrophoresis

จากการทดลองศึกษาถึงสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการจำแนก PGM ที่ pH 5-7 ได้ผลดังนี้

1. ความเข้มข้นของเจล

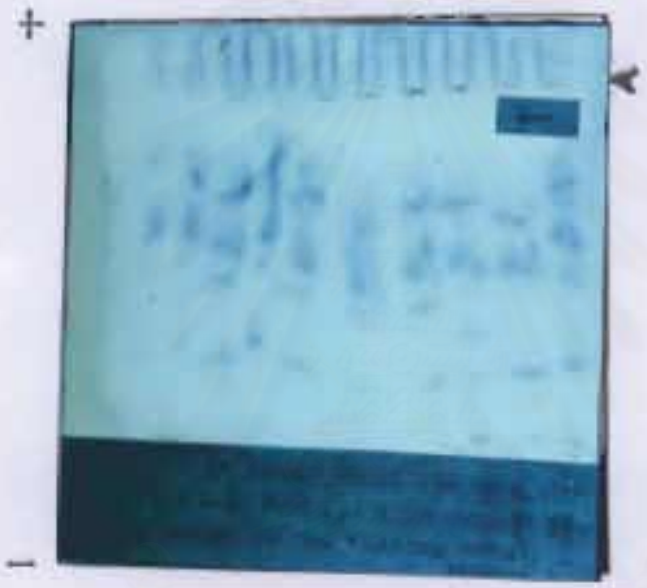
จากการแปรความเข้มข้นของเจลระหว่าง %T เท่ากับ 5.5 , 6.0 และ 7.0 ตามลำดับพบว่า resolution ที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ในทางปฏิบัติ 5.5 %T ให้เจลที่อ่อนนิ่มเกินไป และฉีกขาดง่าย จึงเลือกใช้ 6.0 %T

2. Volt-hour

จากการแปรความต่างศักย์ที่ 400 โวลต์ และ500 โวลต์ และแปรเวลาที่ใช้ในการ run จาก 3 , 4 และ 5 ชม.ตามลำดับ โดยแต่ละครั้งให้กำลังไฟคงที่ที่ 30 วัตต์ พบว่าความต่างศักย์และเวลาที่ใช้ในการ run ที่ให้ resolutionของ PGM ดีที่สุด คือ ที่ความต่างศักย์ 400 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชม. ที่กำลังไฟคงที่ที่ 30 วัตต์

3. Effect of salt

เมื่อเพิ่ม Volt-hour อีก 400 โวลต์เป็นเวลา 3 ชม. แล้วยังพบว่า แถบสี PGM ที่ได้ ยังมีลักษณะเป็นคลื่น ตัวนี้ลักษณะเช่นนี้อาจจะเกิดจากปัจจัยอื่นที่นอกเหนือจากการโฟกัสที่ไม่สมบูรณ์ ปัจจัยนี้ควรอยู่ในระบบอิเลคโตรโฟกัสซิ่ง ไม่ควรอยู่ในสารตัวอย่าง เนื่องจากการเตรียมสารตัวอย่างใช้วิธีเดียวกับในการทดลองเรื่องเซลลูโลสอะซิเตดซึ่งได้แถบสีเป็นเส้นตรง ลักษณะของแถบคลื่นที่ได้เหมือนกับระบบถูกรบกวนด้วยเกลือ ซึ่งน่าจะมาจากสาเหตุเดียวคือ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่ใช้ในการโพลิ-เมอร์ไรซ์เจล ดังรูปที่ 4 และ 5



รูปที่ 4 การจำแนกรูปแบบของ PGK ด้วยไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง บนโพลีอคริลาไมด์-เจลที่โพลิเมอร์ไรซ์ด้วย 10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต และลิคคาม PGK ด้วย activity stain

รูปที่ 5 รูปแบบของ PGM เมื่อแยกด้วยไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง บนโพลิอคริลาไมด์เจล ที่โพลิเมอร์ไรซ์ด้วย 20 มก.% ไรโบฟลาวิน และลีคลาย PGM ด้วย activity stain

การทดลองในรูปที่ 4 และ 5 เป็นการเปรียบเทียบลักษณะแถบสีของ PGM เมื่อแยกด้วยไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่งบนโพลิอคริลาไมด์ความเข้มข้นเท่ากัน (5.5 %T) แต่โพลิเมอร์ไรซ์แยกกันด้วย 10 กรัม% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต และ 20 มก. % ไรโบฟลาวิน (riboflavin) เห็นได้ชัดเจนว่า เจลที่โพลิเมอร์ไรซ์ด้วยตัวให้ free radical ชนิดหลังให้แถบ PGM ชัดเจนและสวยงามกว่ามากจึงทำให้มีอำนาจการจำแนกสูงกว่า

4. ความหนาของเจล จากการแปรความหนาของเจลระหว่าง 0.50 และ 0.75 มม. พบว่าที่ความหนาของเจล 0.50 มม. จะสามารถให้กระแสไฟผ่านเจลได้สูงกว่า เมื่อความหนาของเจลเป็น 0.75 มม. (20 มิลลิแอมป์ 10 วัตต์ และ 10

มิลลิแอมป์ 3 วัตต์ ตามลำดับ) ที่ความต่างศักย์คงที่เท่ากัน คือ 500 โวลต์ และพบว่า band ของไอโซไซม์ของ PGM จะโฟกัสดีขึ้นเมื่อใช้เจลหนา 0.50 มม.

4.2 Isoelectric focusing by Horizontal gel

จากการทดลองที่ผ่านมาทั้งหมด พบข้อสรุปที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของโพลีอคริลาไมด์ คือ มวลโมเลกุลของไอโซไซม์ของ PGM อาจจะไม่แตกต่างกันมากนัก (ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการทดลองจากเซลลูโลสอะซิเตท) ความแตกต่างควรจะอยู่ที่ค่า pI ของมัน จึงได้ทดลองจำแนก PGM ด้วยไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิ่งที่ pH 5-7 โดยใช้ 5.3 %เจล, ความหนาของเจลเท่ากับ 0.1 มม. , 4.8 % Ampholine pH 5-7 ที่ความต่างศักย์คงที่ที่ 2,000 โวลต์ , กำลังไฟ 10 วัตต์ , กระแสไฟ 8 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 2 ชม. 30 นาที

รูปที่ 6 การจำแนก PGM ด้วย Isoelectric focusing by Horizontal gel ที่ pH 5-7 จากโลหิตคนจำนวน 10 ตัวอย่าง Lane 1-10 คือ 1-2-, 1+1-, 1+2+, 1+2-, 1+, 2-, 2+2-, 1+1-, 1+2+, 1- ตามลำดับ และย้อมสาม PGM ด้วย activity stain

จากรูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่า การทำ Isoelectric focusing by Horizontal gel สามารถจำแนกไอโซไซม์ของ PGM ได้ 4 ไอโซไซม์คือ 1-, 1+, 2-, 2+ ทำให้สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM ได้ถึง 10 รูปแบบ คือ 1-, 1+, 1+1-, 2-, 2+, 2+2-, 1-2-, 1-2+, 1+2-, 1+2+ จะเห็นว่าวิธีนี้จะให้อำนาจการจำแนก < Discriminating power > ของ PGM ได้สูงกว่าวิธีของอิเลคโตรโฟรีซีสของแบบเซลลูโลสอะซิเตตและแบบอะกาโรส

การอภิปรายผล

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีส แล้วนำไปประยุกต์ใช้เป็นงานประจำ เพื่อสนับสนุนงานทางด้านการตรวจพิสูจน์และนิติเวชต่อไป ดังนั้นปัจจัยพื้นฐานที่ต้องนำมาพิจารณาสำหรับการพัฒนาระบบด้วยเสมอ คือ

1. ค่าใช้จ่ายที่จะใช้สำหรับระบบเหล่านั้น
2. ความสะดวกและความง่ายในการใช้ระบบนั้นๆ
3. เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

งานวิจัยนี้จึงเริ่มจากระบบที่ง่ายที่สุด และมีราคาถูกที่สุดคือ อิเลคโตรโฟรีซีสบนเซลลูโลสอะซิเตต จากการทดลองพบว่า ระบบนี้สามารถนำมาวิเคราะห์รูปแบบของ PGM จากโลหิตสดได้แน่นอน ข้อดีของระบบนี้คือ ใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อยมาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น แต่ข้อเสียของระบบก็ยังมีคือ ระบบมีความสามารถในการจำแนกไอโซไซม์ได้ต่ำ PGM ถูกจำแนกออกได้เพียง 3 รูปแบบ ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะกับงานที่รีบด่วน หรืองานวิเคราะห์ในเบื้องต้น

จากการทดลองทำอิเลคโตรโฟรีซีสโดยใช้ตัวค้ำจุนประเภทอะกาโรสและสตาร์ชโดยการแปรความเข้มข้นและชนิดของตัวค้ำจุนที่ใช้จนได้ผลดีแล้วนั้น อาจสรุปข้อดี - ข้อเสียของระบบนี้ได้ว่า ระบบเองมีความสามารถในการจำแนกไอโซไซม์ของ PGM ได้ต่ำ คือได้เพียง 3 รูปแบบ และรูปแบบที่ได้มีความชัดเจนต่ำ อาจเนื่องจากการแพร่ของเอนไซม์ในระหว่างการทำอิเลคโตรโฟรีซีส หรือขณะตรวจวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ลักษณะแถบเอนไซม์ที่ได้บ่งบอกว่า การเพิ่มเวลาในการทำอิเลคโตรโฟรีซีสจะไม่ช่วยเพิ่มความคมชัด และอำนาจการแจกแจง

ในขั้นต่อมาได้ทำการทดลองโดยใช้ตัวค้ำจุนประเภทโพลีอคริลาไมด์ ซึ่งมีข้อดีในแง่ที่สามารถแปรขนาดของรูพรุนของเจลได้ตามเปอร์เซ็นต์ของโพลีอคริลาไมด์

แต่พบว่า ไม่สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM ได้ทั้งยังพบปัญหาในด้านกระแสไฟฟ้า, ความต่างศักย์ ตลอดจนไม่สามารถควบคุมความเป็นกรด - ด่างของบัฟเฟอร์ไว้ได้ ไอโซไซม์ของ PGM ควรจะต่างกันในแง่ของค่า pI < Isoelectric point > ดังนั้นจึงทำการทดลองจำแนกรูปแบบของ PGM โดยวิธีไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง < IEF > ที่ pH 5-7 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดแล้ว IEF ทั้งสองระบบได้ผลดีที่สุดในการจำแนก PGMเมื่อเทียบกับอิเลคโตรโฟรีซีสระบบอื่นที่ผ่านมา กล่าวคือ จำแนก PGM_1 ได้ถึง 4 isozymesคือ 1- , 1+ , 2- , 2+ และทำให้เกิด PGM-subtypes ถึง 10 รูปแบบ คือ 1- , 1+ , 1+1- , 2- , 2+ , 2+2- , 1-2- , 1-2+ , 1+2- , 1+2+

การเลือกใช้ระบบได้เหมาะสมต่องานจะทำให้ทั้งสองระบบมีความหมายมากต่องานทางนิติเวช

Horizontal gel ที่ทำโดย chamber ขนาดใหญ่สามารถ type ได้ถึง 20 ตัวอย่าง ในการ run แต่ละครั้ง จึงเหมาะกับงานที่มีจำนวนสารตัวอย่างมาก เช่น การเก็บรวบรวม population data แต่ Vertical Midget electrophoresis ซึ่งเป็นระบบที่ optimize ในห้องปฏิบัติการนี้จนสามารถ type PGM ได้ชัดเจน จนถึง 10 subtypes นั้นใช้กับงานที่มีตัวอย่างจำนวนน้อย และไม่สามารถรอสะสมสารตัวอย่างได้ข้อดีของ Vertical Midget electrophoresis อีกประการหนึ่ง ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลมากขึ้น โดยไม่ต้องเพิ่มค่าใช้จ่าย คือ เราสามารถทำ Vertical Midget-electrophoresis ได้ 2 แผ่นในขณะเดียวกัน แต่ละแผ่นอาจนำไป assay เอนไซม์อย่างน้อย 1 ชนิด เช่น แผ่นหนึ่ง assay PGM อีกแผ่นอาจ assay EAP ก็จะได้ข้อมูลเพิ่มขึ้นในขณะเดียวกัน

ข้อสรุป

1. Cellulose acetate และ Agarose gel electrophoresis สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM จากโลหิตสดได้ 3 รูปแบบ คือ PGM_1 1, PGM_1 2 และ PGM_1 2-1

2. Polyacrylamide gel electrophoresis แบบต่อเนื่อง (pH 7.4) และไม่ต่อเนื่อง (pH8.9) ไม่สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM ได้ ไม่ว่าจะใช้ %T เท่าไรก็ตาม

3. Isoelectric focusing by Horizontal gel ที่ pH 5-7 สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM ได้ 10 รูปแบบ คือ PGM_t1+, PGM_t1-, PGM_t1+1-, PGM_t2+, PGM_t2-, PGM_t2+2-, PGM_t1+2+, PGM_t1+2-, PGM_t1-2+, PGM_t1-2- จึงเพิ่มอำนาจในการแจกแจง < discriminating power > PGM ได้สูงขึ้น

4. Isoelectric focusing by Vertical Midget electrophoresis ที่ pH 5-7 สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM ได้เหมือนใน Horizontal gel และอาจนำไปใช้ทำ Simultaneous typingร่วมกับเอนไซม์อื่นๆได้ด้วย

ข้อเสนอแนะ

งานที่ลุล่วงไปนี้เป็นเพียงส่วนต้นของการนำโพลิมอร์ฟิคเอนไซม์ไปใช้ในงานตรวจพิสูจน์ของประเทศไทย ยังมีงานประเมินศักยภาพการศึกษาของ PGM , การกระจายของรูปแบบ PGM ในหมู่ประชากรไทย เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีโพลิมอร์ฟิคเอนไซม์จากโลหิตมนุษย์อีกเป็นจำนวนมาก ที่ควรจะได้รับการศึกษาในแง่การนำไปใช้งานตรวจพิสูจน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Grunbaum, B.J. (1981) Handbook for Forensic Indiridualization of Human Blood and Bloodstains, 51-114, Sartorius GmbH. Publisher, California.

2. Mitruka, B.M. and Borner, M.J. < 1976 >, Methods of Detection and Identification of Bacteria , m CRC Press, Inc.

3. Hartl, D.D. < 1983 >, Human Genetics , Harper & Row Publisher, N.Y.

4. Kaldor, G. < 1983 >, Methods in Laboratory Medicine 3 : Clinical Enzymology. Praeger Publishers.

5. Bark, J.E., Harris, M.J. and Firth, M., < 1976 >, Typing of the Common Phosphoglucomutase Variants Using Isoelectric-Focusing: A New Interpretation of the Phosphoglucomutase System. J.For. Sci.Soc. 16 :115-120

6. Wraxall,B.G.D. and Stolorow, M.D. < 1986 >, The Simultaneous Separation of the Enzymes Glyoxalase I, Esterase D and Phosphoglucomutase , J. For. Sci. Soc. 31 :1439-1449

7. Divall,G.B. and Ismail, M., < 1983 >, Studies and Observations on the Use of Isoelectric Focusing in Ultra-thin Polyacrylamide Gels as a Method of Typing Human Red Cell Phosphoglucomutase, J. For. Sci. Int. 22 : 253-263