การพัฒนาระบบอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อจำแนกชนิดของโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์บางชนิด สำหรับงานนิติเวชศาสตร์ในประเทศไทย

นางสาวสมพร โชติเกษมสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2535

ISBN 974-582-038-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019202.

DEVELOPMENT OF ELECTROPHORETIC SYSTEM FOR TYPING
OF SOME POLYMORPHIC ENZYMES FOR FORENSIC SCIENCE
IN THAILAND

MISS SOMPORN CHOTEKASEMSUK

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1992
ISBN 974-582-038-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาระบบอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อจำแนกชนิดของโพลีมอร์ฟิค-เอนไซม์บางชนิด สำหรับงานนิติเวชศาสตร์ในประเทศไทย
โดย	นางสาวสมพร โชติเกษมสุข
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา สุนทรส

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

............................คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

............................ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

............................อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา สุนทรส)

............................กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงนันทนา ศิริทรัพย์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สมพร โชติเกษมสุข : การพัฒนาระบบอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์บางชนิด สำหรับงานนิติเวชศาสตร์ในประเทศไทย (DEVELOPMENT OF ELECTROPHORETIC SYSTEM FOR TYPING OF SOME POLYMORPHIC ENZYMES FOR FORENSIC SCIENCE IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุกัญญา สุนทรส, 150 หน้า. ISBN 974-582-038-5

อิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoresis) เป็นวิธีการทางชีวเคมีที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ (polymorphic enzymes) ในงานตรวจพิสูจน์บุคคล งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะประเมินระบบอิเล็กโทรโฟริซิสต่าง ๆ ในการวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์สามชนิดจากโลหิตของมนุษย์ เพื่อใช้ในงานดังกล่าว ได้แก่ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucomutase, PGM), แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase, EAP) และ เอสเทอเรส ดี (esterase D, EsD) โดยเปรียบเทียบ ผลจากระบบอิเล็กโทรโฟริซิสบนอะกาโรส, โพลีอะคริลาไมด์เจล และ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลโดย Vertical midget electrophoresis (VM - IEF), Horizontal mini IEF (HM - IEF) และ Horizontal chamber electrophoresis (H - IEF) ผลของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า อิเล็กโทรโฟริซิสบนอะกาโรสและสตาร์ชที่ pH 7.4 สามารถจำแนก PGM ออกได้เพียง 3 รูปแบบคือ PGM_1 1, PGM_1 2 และ PGM_1 2-1 อิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์ระบบต่อเนื่องที่ pH 7.4 และ ระบบไม่ต่อเนื่องที่ pH 8.9 ไม่สามารถจำแนกไอโซไซม์ของ PGM ออกจากกันได้

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดย H - IEF และที่ pH 5.0 - 6.5 ซึ่งมี 1.2% EPPS โดย HM - IEF สามารถจำแนก PGM ออกได้ resolution สูงที่สุด และได้จำนวนถึง 10 รูปแบบคือ 1+, 1-, 1+1-, 2+, 2-, 2+2-, 1+2+, 1+2-, 1-2+ และ 1-2-

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดย H - IEF และที่ pH 5.0 - 6.5 โดย HM - IEF สามารถจำแนก EAP ออกได้เป็น 3 รูปแบบคือ A, B และ BA การพัฒนาระบบนี้โดยการเพิ่ม 3.14% HEPES สามารถจำแนก EAP และ EsD ได้พร้อมกันโดยจำแนกออกได้เป็น 5 รูปแบบคือ EsD 1, EsD 2, EsD 2.1, EsD 5.1 และ EsD 5.2

จากการศึกษาความเสถียรของ PGM, EAP และ EsD พบว่า PGM มีความเสถียรสูงกว่า EAP และ EsD อายุสูงสุดของคราบโลหิตที่ยังสามารถนำมาวิเคราะห์รูปแบบเอนไซม์ทั้งสามได้ คือ 105, 21 และ 12 วัน ตามลำดับ

ได้ศึกษาการกระจายของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทยด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 และ pH 4-8 โดย H - IEF จากโลหิต 250 ตัวอย่าง พบว่า gene frequency ของ PGM_1 คือ PGM_1^{1+} (0.596), PGM_1^{1-} (0.126), PGM_1^{2+} (0.162) และ PGM_1^{2-} (0.116) gene frequency ของ EAP คือ P^A (0.292) และ P^B (0.708) และ gene frequency ของ EsD คือ EsD 1 (0.688), EsD 2 (0.306) และ EsD 5 (0.006) ส่วนอำนาจในการจำแนก (discriminating power, DP) ของ PGM, EAP และ EsD เท่ากับ 0.79, 0.57 และ 0.59 ตามลำดับ และ DP รวมของทั้งสามเอนไซม์มีค่าสูงถึง 0.96

ภาควิชา ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต [signature]
สาขาวิชา ชีวเคมี	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [signature]
ปีการศึกษา 2535	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

##C225731 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: ELECTROPHORETIC SYSTEM / POLYMORPHIC ENZYMES / FORENSIC SCIENCE

SOMPORN CHOTEKASEMSUK : DEVELOPMENT OF ELECTROPHORETIC SYSTEM FOR TYPING OF SOME POLYMORPHIC ENZYMES FOR FORENSIC SCIENCE IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SUGANYA SOONTAROS, Ph.D. 150 pp.

ISBN 974-582-038-5

Electrophoresis is a biochemical method applicable for polymorphic enzyme analysis for blood individualization. The object of this work is to evaluate the most appropiated electrophoretic system for typing human blood phosphoglucomutase (PGM), erythrocyte acid phosphatase (EAP) and esterase D (EsD). The evaluation was performed on agarose and polyacrylamide gel electrophoretic systems and polyacrylamide gel isoelectric focusing. The latter was by vertical midget electrophoresis (VM - IEF), horizontal mini IEF (HM - IEF) and horizontal chamber electrophoresis (H - IEF). PGM_1 isozymes could be resolved by agarose-starch gel electrophoresis at pH 7.4 into 3 subtytes : PGM_1 1, PGM_1 2 and PGM_1 2-1. Polyarylamide gel electrophoresis (PAGE) with continuous system at pH 7.4 or with discontinuous system at pH 8.9 failed to resolve the isoenzyme. The best resolution with 4 isozymes of 10 subtypes : 1+, 1-, 1+1-, 2+, 2-, 2+2-, 1+2-, 1-2+ and 1-2- was obtained from isoelectric focusing (IEF) on polyacrylamide gel at pH 5-7 by H - IEF and at pH 5.0 - 6.5 with 1.2% EPPS by HM - IEF.

EAP isozymes could be resolved into 3 subtypes : A, B and BA by isoelectric focusing on polyacrylamide gel at pH 4-8 by H - IEF and at pH 5.0 - 6.5 by HM - IEF. By the same system with 3.14% HEPES addition, EAP and EsD could be typed simultaneously. The latter could be resolved into 5 subtypes : EsD 1, EsD 2, EsD 2.1, EsD 5.1 and EsD 5.2.

In stability study, PGM was the most stable polymorphic enzyme. The ages of these three enzymes which were still typeable were 105, 21 and 12 days, respectively.

Gene frequency of PGM, EAP and EsD obtained by isoelectric focusing on polyacrylamide gel at pH 5-7 and 4-8, determined from 250 samples of Thai population were PGM_1^{1+} (0.598), PGM_1^{1-} (0.126), PGM_1^{2+} (0.162), PGM_1^{2-} (0.116), P^A (0.292), P^B (0.708), EsD^1 (0.688) and EsD^5 (0.006) respectively.

Discriminating power of PGM_1, EAP and EsD were 0.79, 0.57 and 0.59, respectively. The total discriminating power resulted from these three polymorphic enzyme typing was 0.96.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต ....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา สุนทรส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำช่วยเหลือการทำวิจัยเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงนันทนา ศิริทรัพย์ ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือบางอย่างของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการเก็บเลือดตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และเพื่อน ๆ ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านและเพื่อน ๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสุดต่อ บิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงิน ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. จ

กิตติกรรมประกาศ... ฉ

สารบัญตาราง.. ฐ

สารบัญรูป.. ฑ

คำย่อ.. ต

บทที่

1 บทนำ... 1

2 ครุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์.. 17

2.2 เคมีภัณฑ์... 18

3 วิธีการทดลอง

3.1 สารตัวอย่าง... 19

3.2 การเตรียมสารละลาย.................................. 20

3.3 การย้อมสีโปรตีน..................................... 23

3.4 การติดตามแอคติวิตี้ของ PGM......................... 24

3.5 การติดตามแอคติวิตี้ของ EAP......................... 25

3.6 การติดตามแอคติวิตี้ของ EsD......................... 25

3.7 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วย
อิเล็กโทรโฟริซิสแบบอะกาโรสและสตาร์ชเจล................ 26

3.8 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วย
อิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล.................. 26

หน้า

3.8.1 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย
อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล ประเภทต่อเนื่อง
(Continuous polyacrylamide gel electrophoresis)
ที่ pH 7.4.................................. 26
3.8.2 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วย
อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล แบบไม่ต่อเนื่อง
Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis)
ที่ pH 8.9.................................. 27
3.9 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง...... 29
3.9.1 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล
ที่ pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่
แยก ในแนวดิ่ง (Vertical midget
electrophoresis)......................... 29
3.9.2 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล
ที่ pH 5-7 และ pH 5.0-6.5 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิส
ขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน
(Horizontal mini IEF).................... 31
3.9.3 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล
ที่ pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยก
ในแนวนอน (Horizontal chamber
electrophoresis)......................... 32

หน้า

3.10 การจำแนกรูปแบบ EAP ด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง..... 34
3.10.1 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 และ pH 4-8 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis)........................ 34
3.10.2 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5.0-6.5 และ pH 6-8 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF)................... 35
3.10.3 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis)........................ 36
3.11 Simultaneous typing............................ 36
3.11.1 การทำ Simultaneous typing ของ PGM และ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis).................. 36
3.11.2 การทำ Simultaneons typing ของ EAP และ EsD ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) 37

หน้า

3.12 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ

3.12.1 การศึกษาความเสถียรของ PGM.................. 38

3.12.2 การศึกษาความเสถียรของ EAP และ EsD........... 38

3.13 การศึกษารูปแบบ PGM, EAP ในแง่การตรวจพิสูจน์

พ่อ-แม่-ลูก (Paternity testing)..................... 38

3.14 การศึกษารูปแบบการกระจายของเอนไซม์

PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย.................... 39

4. ผลการทดลอง

4.1 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิส

บนอะกาโรสและสตาร์ชเจล............................. 40

4.2 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบน

โพลีอะคริลาไมด์เจล.................................. 43

4.2.1 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิส

บนโพลีอะคริลาไมด์เจลประเภทต่อเนื่อง

(Continuous gel electrophoresis)

ที่ pH 7.4................................ 43

4.2.2 การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิส

บนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบไม่ต่อเนื่อง

(Discontinuous gel electrophoresis)

ที่ pH 8.9................................ 45

หน้า

4.3 การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง..... 47
4.3.1 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midgel electrophoresis).......................... 47
4.3.2 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล ที่ pH 5-7 และ pH 5.0-6.5 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF)..................... 52
4.3.3 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis).......................... 60
4.4 การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง...... 63
4.4.1 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis)......... 63
4.4.2 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดเล็กที่แยก ในแนวนอน (Horizontal mini IEF)........... 67
4.4.3 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดใหญ่ที่แยก ในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis).......................... 72

หน้า

4.5 Simultaneous typing of polymorphic enzymes........75

4.5.1 การทำ Simultaneous typing ของ PGM และ EAP โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล ที่ pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis) 75

4.5.2 การทำ Simultaneous typing ของ EAP และ EsD โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล ที่ pH 4-8 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis) 76

4.6 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ

4.6.1 การศึกษาความเสถียรของ PGM.................... 79

4.6.2 การศึกษาความเสถียรของ EAP และ EsD........... 81

4.7 การศึกษารูปแบบของ PGM และ EAP ในแง่การตรวจพิสูจน์ พ่อ-แม่-ลูก (Paternity testing)......... 83

4.8 การศึกษารูปแบบการกระจายของเอนไซม์ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย.................... 86

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.................................. 97

เอกสารอ้างอิง.. 113

ภาคผนวก... 122

ประวัติผู้เขียน.. 150

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการจำแนก PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบต่อเนื่องที่ pH 7.4	44
2	การกระจายของ PGM_1 phenotype และ genes frequency ในประชากรไทย	87
3	การกระจายของ EAP phenotype และ genes frequency ในประชากรไทย	88
4	การกระจายของ EsD phenotype และ genes frequency ในประชากรไทย	89
5	Genes frequency ของ PGM_1 จากประชากรในประเทศต่าง ๆ	90
6	Genes frequency ของ EAP จากประชากรในประเทศต่าง ๆ	91
7	Genes frequency ของ EsD จากประชากรในประเทศต่าง ๆ	92
8	Genes frequency และ Discriminating power ของ PGM_1, EAP และ EsD ในประชากรไทย	94
9	Discriminating power ของ PGM, EAP และ EsD ในประชากรไทย, คนผิวดำ (Black) และคนผิวขาว (White) จาก Maryland	95
10	ความเข้มสัมพัทธ์ของไอโซไซม์ใน PGM ทั้ง 10 รูปแบบ	132
11	ความเข้มสัมพัทธ์ของไอโซไซม์ใน EAP ทั้ง 6 รูปแบบ	135
12	การคำนวน Expected frequency และ X^2 ของ PGM_1 ในประชากรไทย	142
13	การคำนวน Expected frequency และ X^2 ของ EAP ในประชากรไทย	145
14	การคำนวน expected frequency และ X^2 ของ EsD ในประชากรไทย	147

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	กำเนิดของไอโซเอนไซม์ที่เกิดจากการรวมตัว (association) ของโปรตีนหน่วยย่อย (A, B) ที่เกิดจากยีนโครงสร้างที่แตกต่างกัน (a, b)..	3
2	ไดอะแกรมแสดงการจำแนก PGM_1 ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแป้ง............	8
3	ไดอะแกรมแสดงการจำแนก EAP ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนสตาร์ช	11
4ก	ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูปที่ 4ข.........................	41
4ข	การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบน อะกาโรสและสตาร์ช ความเข้มข้นอย่างละ 1% ที่ pH 7.4	42
5	การจำแนกรูปแบบของ PGM ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล แบบไม่ต่อเนื่อง (Discontinuous polyacrylamide gel) ที่ pH 8.9 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis)..................................	46
6	ผลของแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตต่อระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบน โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 ในการจำแนกรูปแบบของ PGM โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis)..................................	48
7ก	ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูป 7ข........................	49
7ข	ผลของไรโบฟลาวินต่อระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบน โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 ในการจำแนกรูปแบบของ PGM โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis)..................................	50

หน้า

8ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูปที่ 8ข........................ 53

8ข การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบน
โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่
แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF)....... 54

9ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูป 9ข.......................... 55

9ข การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบน
โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5.0-6.5 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟเรซิสขนาดเล็กที่
แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF)....... 56

10ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูป 10ข......................... 58

10ข การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบน
โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5.0-6.5 ที่มี 1.2% EPPS
โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน
(Horizontal mini IEF)..................................... 59

11ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ PGM ในรูป 11ข......................... 61

11ข การจำแนกรูปแบบ PGM ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบน
โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดใหญ่ที่
แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrop.horesis).......... 62

12ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ EAP ในรูปที่ 12ข...................... 64

12ข การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบน
โพลีอะคริลาไมด์เจล pH 5-7 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่
แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis..)............. 65

13 การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบน
โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟรีซิสขนาดเล็กที่
แยกในแนวดิ่ง (Vertical midget electrophoresis...)............ 66

หน้า

14 การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 6-8 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF)........................... 68

15ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ EAP ในรูป 15ข........................... 70

15ข การจำแนกรูปแบบ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5.0-6.5 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดเล็กที่แยกในแนวนอน (Horizontal mini IEF).................. 71

16ก ไดอะแกรมแสดงรูปแบบของ EAP ในรูปที่ 16ข........................ 73

16ข การจำแนกรูปแบบของ EAP ด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจล pH 4-8 โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis)............ 74

17ก ไดอะแกรมแสดงรูปของ EAP, EsD ในรูปที่ 17ข....................... 77

17ข Simultaneous typing ของ EAP และ EsD โดยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 4-8 และใช้ 3.14% HEPES เป็น spacer โดยเครื่องทำอิเล็กโทรโฟริซิสขนาดใหญ่ที่แยกในแนวนอน (Horizontal chamber electrophoresis).......... 78

18 รูปแบบของ PGM ชนิด 1+2+ ในคราบเลือด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 0-105 วัน.................................... 80

19 รูปแบบของ EAP ชนิด B และ EsD ชนิด 2 ในคราบเลือดเมื่อเก็บไว้ที่ที่อุณหภูมิห้อง อายุ 0-27 วัน.................................... 82

20 การใช้รูปแบบ PGM ใการตรวจปฏิเสธพ่อ-แม่-ลูก........................ 84

21 การใช้รูปแบบ EAP ในการตรวจปฏิเสธ พ่อ-แม่-ลูก...................... 85

22 ภาพถ่ายและไดอะแกรมแสดงการจำแนกรูปแบบ PGM_1 ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนสตาร์ช 123

หน้า

23 ภาพถ่ายและไดอะแกรมของไอโซไซม์ a ของ $PGM_1$1 ที่ได้จากการจำแนกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนสตาร์ชในตอนแรกหลังจากนำมาจำแนกด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 125

24 ภาพถ่ายและไดอะแกรมของไอโซไซม์ b ของ $PGM_1$2 ที่ได้จากการจำแนกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนสตาร์ชในตอนแรกหลังจากนำมาจำแนกด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 126

25 ภาพถ่ายและไดอะแกรมของไอโซไซม์ c ของ $PGM_1$1 ที่ได้จากการจำแนกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนสตาร์ชในตอนแรกหลังจากนำมาจำแนกด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 128

26 ภาพถ่ายและไดอะแกรมของไอโซไซม์ d ของ $PGM_1$2 ที่ได้จากการจำแนกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนสตาร์ช ในตอนแรกหลังจากนำมาจำแนกด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงบนโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ pH 5-7 129

27 ไดอะแกรมของไอโซไซม์ใน PGM_1 ทั้ง 10 รูปแบบที่ได้จากการจำแนกด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงที่ pH 5-7 131

28 ไดอะแกรมของไอโซไซม์ใน EAP ทั้ง 6 รูปแบบที่ได้จากการนจำแนกด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงที่ pH 4-8 134

29 ไดอะแกรมของไอโซไซม์ใน EsD ทั้ง 5 รูปแบบที่ได้จากการจำแนกด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงที่ pH 4-8 137

30 Diagram of X^2 139

คำย่อ

df	=	degree of freedom
DP	=	discriminating power
EAP	=	erythrocyte acid phosphatase
EsD	=	esterase D
PGM	=	phosphoglucomutase
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
pI	=	isoelcetric point
IEF	=	isoelectric focusing
H-IEF	=	horizontal chamber electrophoresis, isoelectric focusing
HM-IEF	=	horizontal mini IEF, isoelectric focusing
VM-IEF	=	vertical midget electrophoresis, isoelcetric focusing
X_2	=	Chi-square