



## บทที่ 4

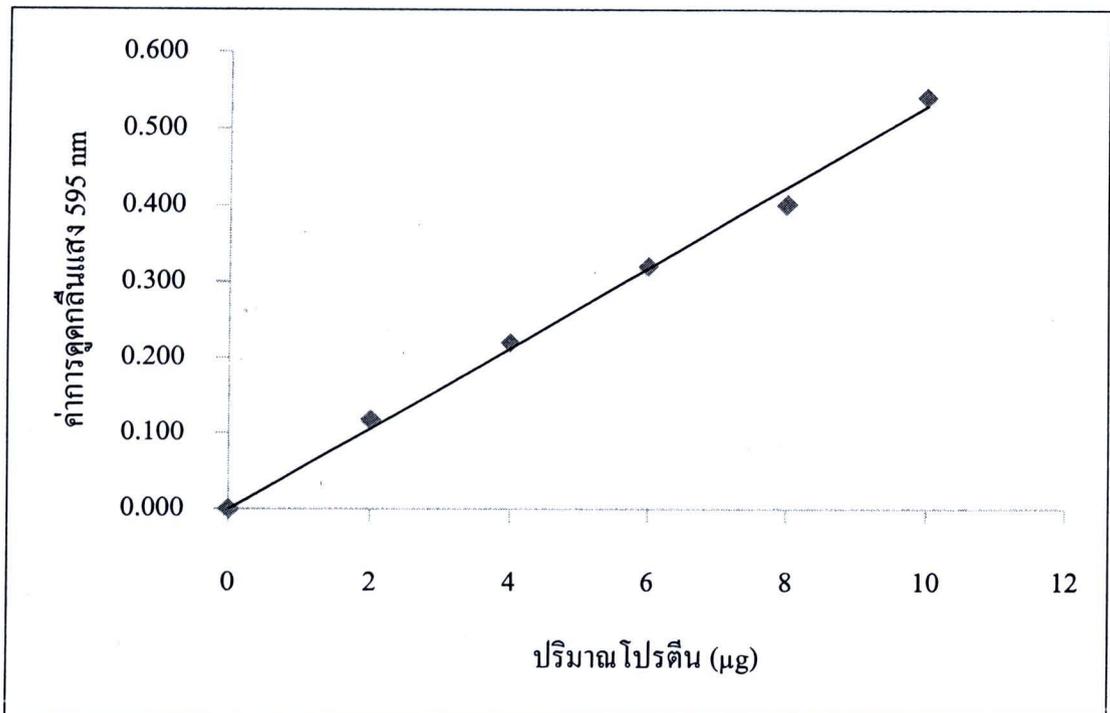
### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนในเลือดสัตว์

ในการหาปริมาณโปรตีนในเลือดสัตว์ด้วยวิธี Bradford จะใช้หลักการจับกันของสีย้อม Coomassie brilliant blue กับโปรตีนในสภาวะที่เป็นกรด โดยเมื่อสีย้อมจับกับโปรตีนแล้ว การดูดกลืนแสงของสีย้อมจะเปลี่ยนจากเดิมที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 465 nm เป็นที่ความยาวคลื่น 595 nm และค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของโปรตีน ด้วยเหตุนี้ในการทดลองจึงได้ทำกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA เพื่อที่จะได้นำไปใช้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ของสารละลายมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณต่างๆ กัน และเมื่อนำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง พบว่าได้ผลดังภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของสารละลายมาตรฐาน BSA

ปริมาณ BSA ( $\mu\text{g}$ )	ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.113	0.122	0.117	0.117
4	0.219	0.219	0.220	0.219
6	0.318	0.322	0.321	0.320
8	0.404	0.400	0.399	0.401
10	0.540	0.541	0.541	0.541



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของ BSA

เมื่อนำซีรัมของคนมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm เฉลี่ยเท่ากับ 0.087 และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 51.55 µg แต่เนื่องจากซีรัมของคนที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน มีปริมาตรเท่ากับ 1 µl จึงสามารถคำนวณหาปริมาณของโปรตีนในซีรัมคนได้เท่ากับ 51.55 µg/µl

จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของเลือดจากสัตว์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งใช้วิธี Bradford และใช้การคำนวณแบบเดียวกับที่กล่าวข้างต้น พบว่าได้ผลดังตารางที่ 4.2 โดยเลือดสัตว์ที่มีปริมาณโปรตีน > 300 µg/µl มี 1 ชนิด คือ คน เลือดสัตว์ที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 201-300 µg/µl มี 2 ชนิด ได้แก่ สุนัข และแกะ เลือดสัตว์ที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 101-200 µg/µl มี 9 ชนิด ได้แก่ เป็ด หมู ไก่ วัว ปลาทับทิม กระต่าย นก แมว แพะ สำหรับสัตว์ที่มีปริมาณโปรตีนในเลือด < 100 µg/µl มี 5 ชนิด ได้แก่ หนู กบ ปลานิล ปลาดุก และปลาไหล

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนของเลือดสัตว์ชนิดต่างๆ

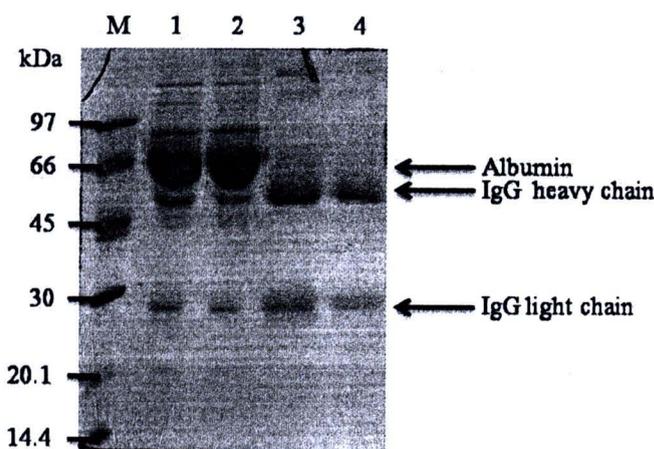
ชนิดของเลือดสัตว์	ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน ในเลือดสัตว์( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
1. คน	325.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
2. ปลาทับทิม	119.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
3. ปลานิล	75.61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
4. แปะะ	102.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
5. แกะ	235.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
6. วัว	127.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
7. กระจ่าง	118.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
8. กบ	80.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
9. หมู	131.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
10. ไก่	130.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
11. เป็ด	133.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
12. หนู	94.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
13. สุนัข	233.45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
14. ปลาไหล	36.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
15. นก	121.90 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
16. ปลาดุก	64.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
17. แมว	106.00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

#### 4.2 การเตรียม Anti-human IgG

(1) ผลการวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของ IgG โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

เมื่อนำซีรัมคนมาทำบริสุทธิ์ IgG โดยใช้วิธีการจับกับ Protein G Sepharose bead แล้วทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ได้บน SDS-PAGE เทียบกับซีรัมคนก่อนทำบริสุทธิ์ พบว่าในซีรัมแถบโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีจำนวนลดลง (ภาพที่ 4.2 Lane 3) เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนที่พบในซีรัมก่อนทำบริสุทธิ์ (ภาพที่ 4.2 Lane 1, 2) โดยเห็นได้ชัดว่าแถบโปรตีน Albumin (65 kDa) หายไป และพบแถบโปรตีนที่เห็นได้ชัดจำนวน 2 แถบ ได้แก่ IgG heavy chain (ขนาด 55 kDa) และ IgG light chain (ขนาด 25 kDa) จากผลเหล่านี้แสดงว่าการทำบริสุทธิ์ IgG

ได้ผล แต่อย่างไรก็ตามยังพบแถบโปรตีนที่มีขนาด > 97 kDa (ภาพที่ 4.2 Lane 3) ซึ่งหากนำไปใช้กระตุ้นการสร้าง Ant-human IgG ในหนูทดลอง อาจทำให้ได้แอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดอื่นด้วย ดังนั้นเพื่อให้ IgG บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น จึงนำ IgG ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ครั้งแรก มาทำบริสุทธิ์อีกครั้ง โดยใช้การจับกับ Protein G Sepharose bead ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ พบว่า IgG ที่ทำบริสุทธิ์อีกครั้งนั้น มีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นน้อยลงเมื่อเทียบกับการทำบริสุทธิ์ครั้งที่ 1 (ภาพที่ 4.2 Lane 4)



ภาพที่ 4.2 รูปแบบของโปรตีนในซีรัมของคนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Protein G Sepharose bead 1 ครั้ง (Lane 3) และ 2 ครั้ง (Lane 4) เปรียบเทียบกับ โปรตีนในซีรัมของคนก่อนทำบริสุทธิ์ (Lane 1, 2) โดยมีแถบโปรตีนของ Low molecular weight marker (Lane M) ที่ทราบขนาดเป็นตัวเปรียบเทียบ

## (2) ผลการตรวจหา Anti-human IgG ในซีรัมของหนูโดยใช้เทคนิค ELISA

เพื่อยืนยันว่าหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย Human IgG สร้าง Anti-human IgG สร้างแอนติบอดีดังกล่าวจริง จึงได้ทำการตรวจหา Anti-human IgG ในซีรัมของหนู โดยเคลือบแอนติเจน (Human IgG) บนหลุมของ Microtiter plate จากนั้นเติมซีรัมของหนูที่ได้เจือจางหลายๆ เท่า ได้แก่  $1:10$ ,  $1:10^2$ ,  $1:10^3$ ,  $1:10^4$  และ  $1:10^5$  โดยเติม 1 ค่าการเจือจางต่อหลุม จากนั้นจึงเติม Goat anti-mouse IgG ที่ติดฉลากด้วย Alkaline phosphatase ลงไปเพื่อดูการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (Human-IgG) และแอนติบอดี (Anti-human IgG) ใน Microtiter plate ซึ่งสามารถสังเกตการเกิดปฏิกิริยาได้โดยนำ Microtiter plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ตารางที่ 4.3 และ 4.4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมหนูที่หลายๆ Dilution หลังจากถูกกระตุ้นครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

จากตารางที่ 4.3 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจากซีรัมหนูก่อนถูกกระตุ้นมีค่าน้อยมาก แสดงว่าในซีรัมหนูก่อนถูกกระตุ้นไม่มี Human-IgG จึงไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง แอนติเจนและแอนติบอดี หลังจากหนูถูกกระตุ้นพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมหนูมีค่ามากขึ้น อย่างชัดเจนแสดงว่าหนูทดลองสร้าง Anti-human IgG หลังจากถูกกระตุ้น อย่างไรก็ตามเมื่อ วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมหนูที่ค่าเจือจางต่างๆ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงตามค่า การเจือจางของซีรัมที่เพิ่มขึ้น ซึ่ง Dilution สูงสุดของซีรัมหนู (Anti-human IgG) ตัวที่ 1, 2 และ 4 ที่ยังสามารถเห็นการค่าการดูดกลืนแสงได้อย่างชัดเจน คือ  $1:10^4$  เท่า ดังนั้นค่าไคเตอร์ของซีรัมหนู หลังจากถูกกระตุ้นครั้งที่ 1 มีค่าเท่ากับ  $1:10,000$  ซึ่งยังต่ำอยู่ จึงต้องกระตุ้นครั้งที่ 2 เพื่อให้หนูสร้าง Anti-human IgG มากขึ้น จากการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมหนูหลังจากถูกกระตุ้นครั้งที่ 2 (ตารางที่ 4.4) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมที่ค่าความเจือจาง  $1:10$  เท่า มีค่ามากกว่าซีรัม ของหนูหลังจากถูกกระตุ้นครั้งที่ 1 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน แสดงว่าการกระตุ้นครั้งที่ 2 ทำให้หนู สร้าง Anti-human IgG เพิ่มมากขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ค่า ไคเตอร์ของซีรัมหนูหลังจากถูกกระตุ้น ครั้งที่ 2 พบว่ามีค่าเท่ากับ  $1:100,000$  ซึ่งสูงกว่าการกระตุ้นครั้งแรก

**ตารางที่ 4.3** ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง Human-IgG และ Dilution ต่างๆ ของซีรัมหนูทดลองหลังจากถูกกระตุ้นครั้งที่ 1

หนูตัวที่	ซีรัมหนูก่อนถูก กระตุ้น (เจือจาง $1:10^2$ )	ค่าเจือจางของซีรัมหนู (เท่า)				
		$1:10$	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$
1	0.002	0.600	0.597	0.432	0.122	0.007
2	0.003	0.565	0.291	0.133	0.015	-0.014
3	-	-	-	-	-	-
4	0.016	0.596	0.621	0.341	0.083	0.003

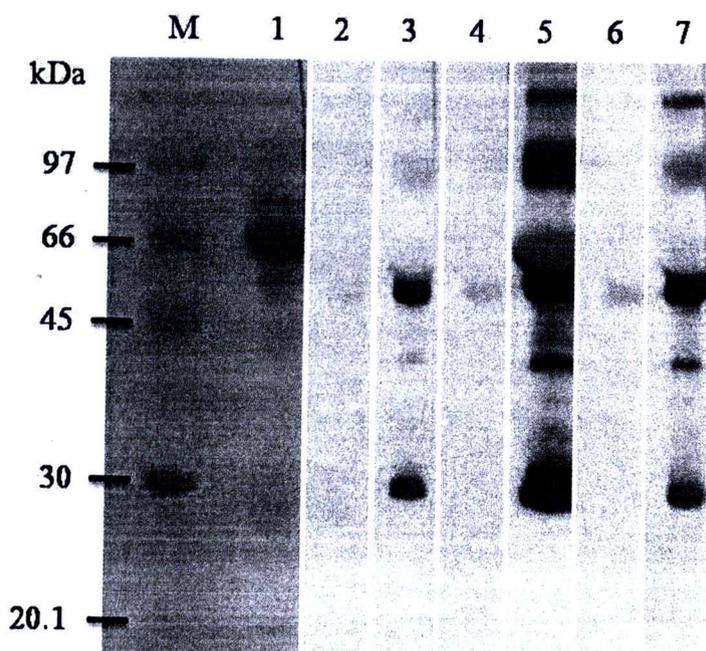
ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง Human-IgG และ Dilution ต่างๆ ของซีรัมหนูทดลองหลังจากถูกกระตุ้นครั้งที่ 2

หนูตัวที่	ค่าเงื้องางของซีรัมหนู (เท่า)					
	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>6</sup>
1	0.837	0.722	0.494	0.371	0.084	0.138
2	-	-	-	-	-	-
3	0.845	0.754	0.605	0.381	0.216	0.082
4	1.744	1.969	2.301	0.746	0.673	0.458

(3) ผลการวิเคราะห์หาไตเตอร์ของ Anti-human IgG ด้วยเทคนิค Western

immunoblotting

นอกจากจะใช้วิธี ELISA วิเคราะห์ว่าหนูทดลองสร้าง Anti-human IgG หรือไม่ งานวิจัยนี้ยังใช้เทคนิค Western immunoblotting มาวิเคราะห์ด้วย โดยแยกแอนติเจน (Human IgG จากซีรัมคน) ด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นจึงย้ายโปรตีนทั้งหมดจากตัวกลางที่เป็นอะครีลาไมด์เจล ไปอยู่บน Nitrocellulose ซึ่งเป็นตัวกลางที่ทำให้แอนติบอดีจับกับแอนติเจนได้ จากนั้นจึงนำแผ่น Nitrocellulose ที่มีโปรตีนจากซีรัมคนไปแช่ในแอนติบอดี (ซีรัมหนูที่ผ่านการกระตุ้นให้สร้าง Anti-human IgG) ที่เงื้องางหลายๆ ค่าความเข้มข้น แล้วจึงเติม Goat anti-human IgG antibody ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase ลงไปเพื่อดูการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4.3) พบว่ามีการสร้าง Anti-human IgG ในซีรัมของหนูทดลองทั้งตัวที่ 1, 2 และ 4 (ภาพที่ 4.3 Lane 3, 5, 7) ที่มีความจำเพาะต่อ Human IgG heavy chain และ Human IgG light chain มากขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนสร้าง Anti-human IgG ในซีรัมของหนูทดลอง (ภาพที่ 4.3 Lane 2, 4, 6) และผลจากการหาไตเตอร์ ด้วยเทคนิคนี้ (ภาพที่ 4.4) พบว่าแถบโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อ Human IgG heavy chain และ Human IgG light chain จะลดลงตามค่าการเงื้องางของซีรัมที่เพิ่มขึ้น ซึ่ง Dilution สูงสุดของซีรัมหนู (Anti-human IgG) ตัวที่ 1, 2 และ 4 ที่ยังสามารถเห็นการแถบโปรตีนของ IgG heavy chain และ light chain ได้อย่างชัดเจน คือ 1:10<sup>3</sup> เท่า ดังนั้นค่าไตเตอร์ของซีรัมหนูหลังจากถูกกระตุ้นครั้งที่ 1 มีค่าเท่ากับ 1:1,000 (ภาพที่ 4.4 Lane 3)



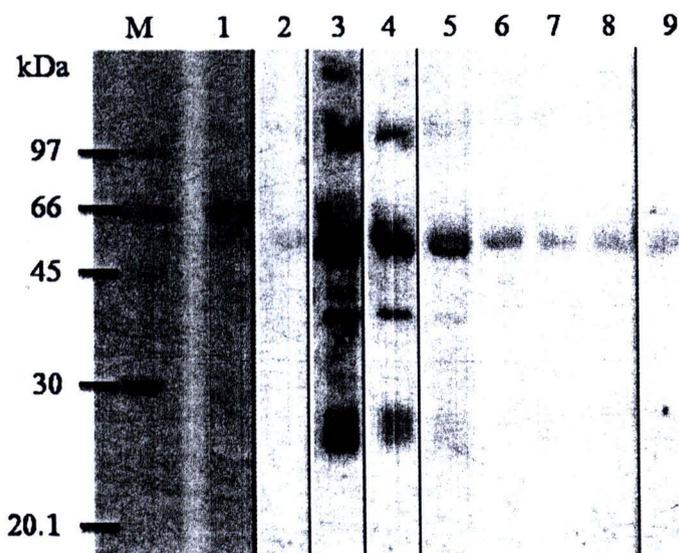
ภาพที่ 4.3 ผลการทำ Western immunoblotting เพื่อตรวจสอบการสร้าง Anti-human IgG ในหนูทดลองหลังถูกกระตุ้นด้วย Human IgG ครั้งที่ 1

Lane 1: ซีรัมคนที่ย้อมด้วย 0.1% Amido black

Lane 2, 4, 6: ซีรัมคนที่แช่ในซีรัมของหนูตัวที่ 1, 2, 4 ก่อนถูกกระตุ้น (เจือจาง 1:100)

Lane 3, 5, 7: ซีรัมคนที่แช่ในซีรัมของหนูตัวที่ 1, 2, 4 หลังถูกกระตุ้น (เจือจาง 1:500)

Lane M: Low molecular weight marker



ภาพที่ 4.4 ผลการทำ Western immunoblotting เพื่อตรวจสอบการสร้าง Anti-human IgG ในหนูทดลองหลังถูกกระตุ้นด้วย Human IgG ครั้งที่ 3

Lane 1: ซีรัมคนที่ย้อมด้วย 0.1% amido black

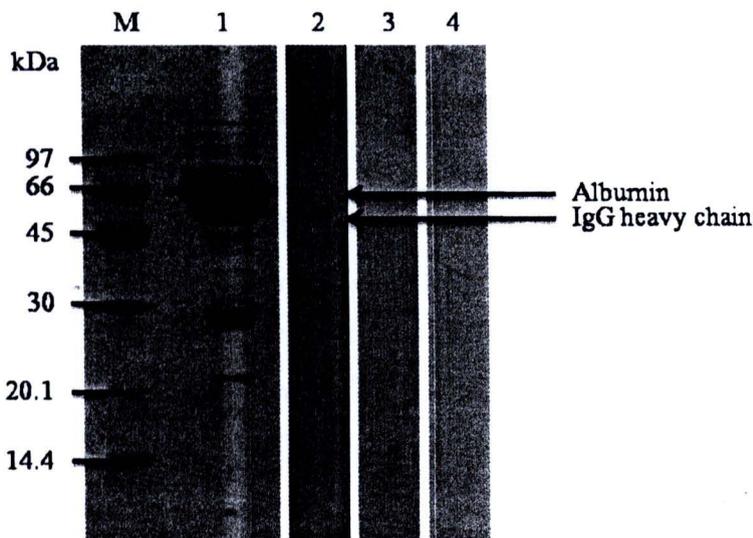
Lane 2: ซีรัมคนที่แช่ในซีรัมของหนูตัวที่ 3 ก่อนถูกกระตุ้น (เจือจาง  $1:10^3$ )

Lane 3-9: ซีรัมคนที่แช่ในซีรัมของหนูตัวที่ 3 หลังถูกกระตุ้น (เจือจาง  $1:10^3$ ,  $1:10^4$ ,  $1:10^5$ ,  $1:10^6$ ,  $1:10^7$ ,  $1:10^8$ ,  $1:10^9$  ตามลำดับ)

Lane M: Low molecular weight marker

#### 4.3 ผลการติดฉลาก Anti-human IgG กับเอนไซม์ Alkaline phosphatase

นำซีรัมของหนูทดลองที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าสร้าง Anti-human IgG ในหนูทดลองตัวที่ 3 มาทำบริสุทธิ์โดยจับกับ Protein G Sepharose beads จากนั้นจึงนำไปติดฉลากกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase เพื่อนำไปใช้ในการระบุเลือดคนต่อไป อย่างไรก็ตามก่อนจะนำแอนติบอดีนี้ไปใช้ จำเป็นต้องทดสอบว่าแอนติบอดีที่ติดฉลากสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับ Human IgG หรือไม่ โดยใช้เทคนิค Western immunoblotting โดยใช้ซีรัมคนเป็นแอนติเจนและใช้ Anti-human IgG ที่ได้ทำบริสุทธิ์และติดฉลากด้วยเอนไซม์เป็นแอนติบอดี จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4.5) พบว่า Anti-human IgG ที่ทำการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase มีความจำเพาะต่อ IgG heavy chain แต่เกิดการ Cross react กับแถบโปรตีน Albumin และค่าไตเตอร์ของ Anti-human IgG ที่ทำการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase มีค่าประมาณ  $1:10$  (ภาพที่ 4.5 Lane 2)



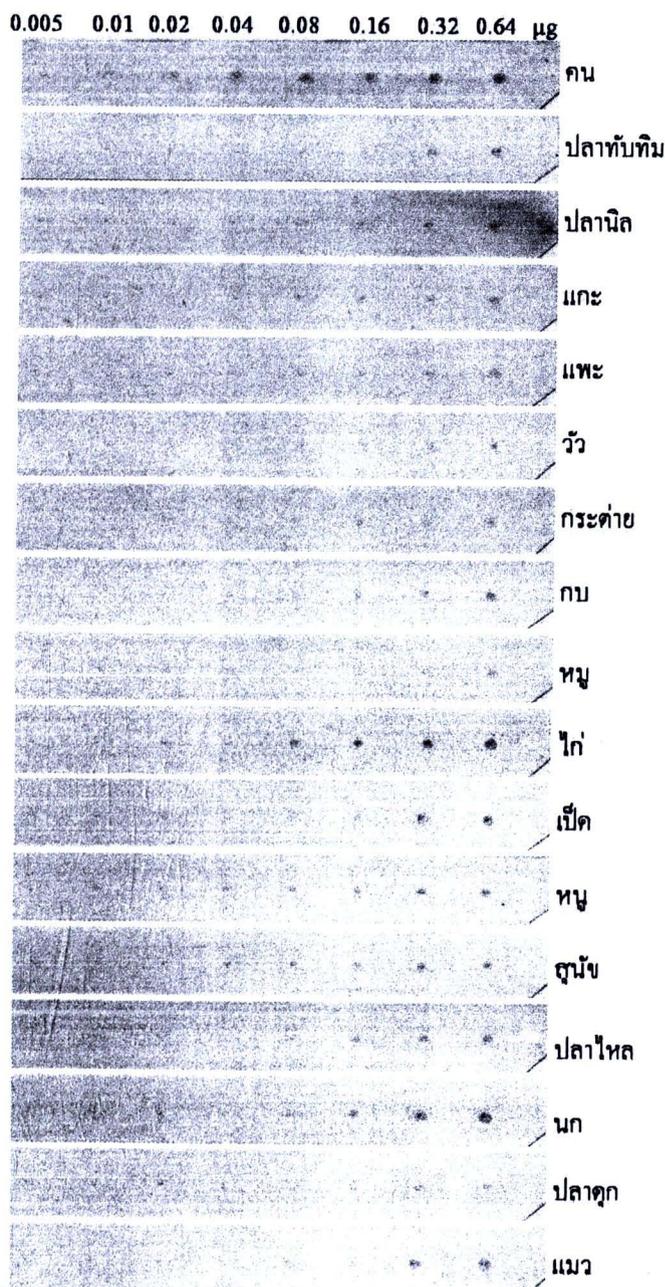
ภาพที่ 4.5 ผลการทำ Western immunoblotting โดยใช้ Anti-human IgG ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ จากซีรัมหนูทดลองแล้วติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase  
 Lane 1: ซีรัมของคนที่ย้อมด้วย 0.1% Amido black  
 Lane 2-4: ซีรัมคนที่แช่ใน Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วย Alkaline phosphatase ที่ความเข้มข้นเจือจางเท่ากับ 1:10, 1:50 และ 1:100 ตามลำดับ  
 Lane M: Low molecular weight marker

#### 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) และความไว (Sensitivity) ของ Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase โดยใช้เทคนิค Dot blotting

เมื่อนำ Anti-human IgG ที่ได้ทำบริสุทธิ์และติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase มาตรวจสอบกับเลือดสัตว์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Dot blotting โดยที่นำเลือดสัตว์มาหยดบนแผ่น Nitrocellulose ที่มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 และ 0.64  $\mu\text{g}$  ตามลำดับ จากนั้นจึงนำไปทดสอบกับ Anti-human IgG ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase หลังจากเติมสับสเตรท ของเอนไซม์เพื่อดูการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี พบว่า Anti-human IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase สามารถเกิดปฏิกิริยากับเลือดสัตว์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 4.6) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความไวของการเกิดปฏิกิริยา (ปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดที่สามารถเห็นปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจน) พบว่า Anti-human IgG สามารถเกิดปฏิกิริยากับเลือดของคนที่มีปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 0.02  $\mu\text{g}$  สำหรับสัตว์ชนิดอื่นๆ พบว่าเลือดไก่ หนู และนก สามารถเกิดปฏิกิริยาได้

ที่ปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดเท่ากับ 0.08  $\mu\text{g}$  ส่วนเลือดปลาทับทิม ปลานิล แพะ แกะ กระจ่าย กบ เป็ด สุนัข ปลาไหล และแมว สามารถเห็นการเกิดปฏิกิริยาที่ปริมาณโปรตีนต่ำสุดเท่ากับ 0.16  $\mu\text{g}$  ขณะที่ปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดที่สามารถมองเห็นปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี ในเลือด ปลาคูก วัว และหมู มีค่าเท่ากับ 0.32  $\mu\text{g}$

ถึงแม้ว่า Anti-human IgG ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์จากหนูทดลอง แล้วนำมาติดฉลากด้วย เอนไซม์ จะสามารถเกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) กับเลือดของสัตว์ชนิดอื่นๆ แต่หากพิจารณา ปริมาณของ โปรตีนที่เกิดปฏิกิริยาแล้ว พบว่าหากใช้ตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.02  $\mu\text{g}$  มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีดังกล่าว ก็จะสามารถใช้ระบุเลือดคนได้ เพราะเลือดสัตว์ชนิด อื่นที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากันจะไม่เกิดปฏิกิริยากับ Anti-human IgG

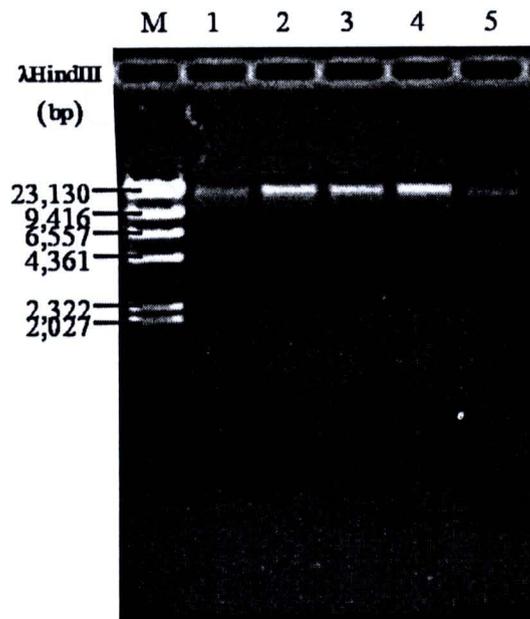


ภาพที่ 4.6 ผลการทำ Dot blotting ระหว่างเลือดสัตว์หลายๆ ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน กับ Anti-human IgG ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และติดฉลากด้วยเอนไซม์

#### 4.5 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

##### (1) เลือด

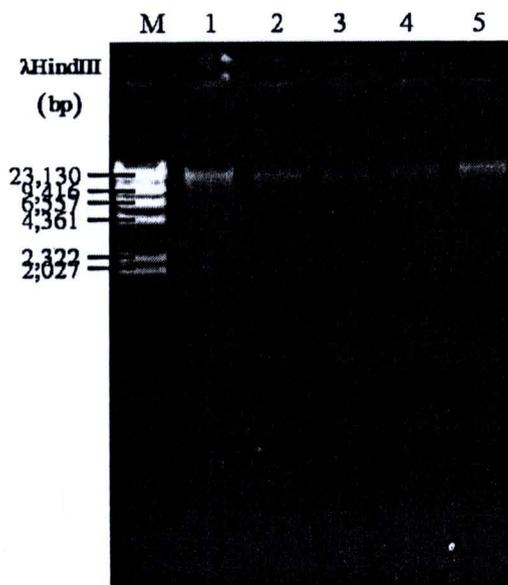
เมื่อนำเลือดคนจำนวน 5 คน จากอาสาสมัครที่ไม่มี ความเกี่ยวข้องกัน มาสกัด Genomic DNA โดยใช้ Illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไป วิเคราะห์ขนาด และความบริสุทธิ์บน 0.8% Agarose gel พบว่า Genomic DNA ที่ได้มีขนาด ประมาณ 23,000 bp และมีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเออื่นๆ (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดของอาสาสมัคร 5 คน (Lane 1-5) เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)

##### (2) เส้นผม

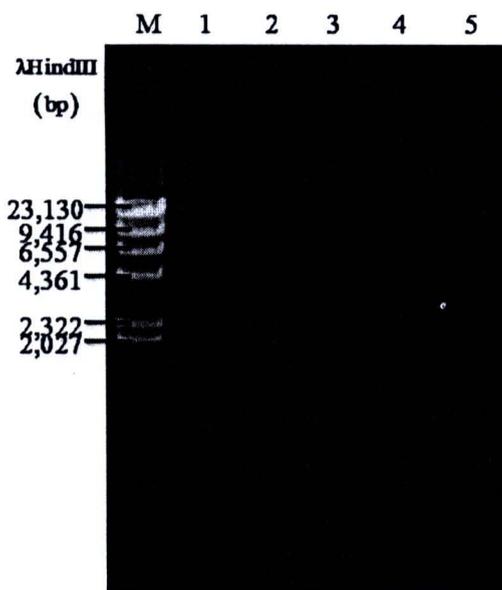
เมื่อนำเส้นผมจากอาสาสมัคร จำนวน 5 คน ที่ไม่มี ความเกี่ยวข้องกัน มาสกัด Genomic DNA ด้วย Illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไป วิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์บน 0.8% Agarose gel พบว่า Genomic DNA ที่ได้มีขนาด ประมาณ 23,000 bp และมีความบริสุทธิ์ (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นผมของอาสาสมัคร 5 คน (Lane 1-5) เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)

### (3) น้ำลาย

เมื่อนำน้ำลายจากอาสาสมัคร 5 คน ที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันมาสกัด Genomic DNA ด้วย Illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์บน 0.8% Agarose gel พบว่า Genomic DNA ที่ได้มีขนาดประมาณ 23,000 bp (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากน้ำลายของอาสาสมัคร 5 คน (Lane 1-5) เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)

เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด เส้นผม และน้ำลาย พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดมีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมากกว่าเส้นผม และน้ำลาย ทั้งที่โหลดตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาณเท่ากันลงในเจล ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเลือดคนมีจำนวนเซลล์มากกว่ารากผม และน้ำลาย เมื่อเทียบในปริมาณที่เท่ากัน ทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดมีปริมาณมากที่สุด

#### 4.6 ผลการวิเคราะห์ขนาดของ STR 10 ตำแหน่ง โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

เมื่อใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ STR จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ D8S1179, D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, vWA, TH01, CSF1PO และ D16S539 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือด เส้นผม และน้ำลาย เป็นแม่แบบ เมื่อนำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์ด้วยการแยกด้วยไฟฟ้าในตัวกลางอะครีลาไมด์เจล 8% พบว่าผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ STR 10 ตำแหน่ง จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดคน เส้นผม และน้ำลาย แสดงดังภาพที่ 4.10, 4.12 และ 4.14 ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.10 พบว่าผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของเลือดคนแต่ละคน ตำแหน่งที่ D8S1179 มีขนาดต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของจำนวนซ้ำ ที่พบบนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง (Loci) เดียวกัน สามารถพบความแตกต่างนี้ได้ ซึ่งความแตกต่างเกิดจากการมีโครโมโซมชนิด Autosomal

chromosome 2 ชุด ชุดหนึ่งได้มาจากแม่จะรับรูปแบบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของแม่มา อีกชุดหนึ่งได้มาจากพ่อก็จะรับรูปแบบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของพ่อมา ทำให้ที่ตำแหน่งเดียวกันจะมี 2 Allele เสมอ Allele ที่เหมือนกันเรียกเป็น Homozygous หรือ Allele ที่ต่างกันเรียก Heterozygous ซึ่งในอาสาสมัครคนที่ 1 นั้นพบ 2 Allele คือ Allele 1-1 และ 1-2 ซึ่งเป็น Heterozygous เนื่องจากมี Allele ที่ต่างกัน (ภาพที่ 4.10 Lane 1) ในอาสาสมัครคนที่ 2 พบ Allele คือ Allele 1-3 และ 1-3 ซึ่งเป็น Homozygous เนื่องจากมี Allele ที่เหมือนกัน (ภาพที่ 4.10 Lane 2) ในอาสาสมัครคนที่ 3 พบ Allele คือ Allele 1-4 และ 1-5 (ภาพที่ 4.10 Lane 3) ในอาสาสมัครคนที่ 4 พบ Allele คือ Allele 1-6 และ 1-6 (ภาพที่ 4.10 Lane 4) ในอาสาสมัครคนที่ 5 พบ Allele คือ Allele 1-7 และ 1-8 (ภาพที่ 4.10 Lane 5) และผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของเลือดคนตำแหน่งที่ D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, vWA, TH01, CSF1PO และ D16S539 (ตารางที่ 4.5) และจากรูปที่ 4.12 และ 4.14 พบว่าผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของเส้นผม และน้ำลาย ทั้ง 10 ตำแหน่งให้ผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของคนคนเดียว ในตำแหน่งเดียวกันให้ผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ที่เหมือนกับตารางที่ 4.5 ซึ่ง Allele ที่พบในแต่ละคนแต่ละตำแหน่ง นั้นแสดงให้เห็นความแตกต่างในแต่ละคน ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของในแต่ละคน ซึ่งสามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

เพื่อพิสูจน์ว่า STR 10 ตำแหน่ง สามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้ดังนั้นเราจึงสมมุติให้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือด เส้นผม และน้ำลาย เป็นตัวอย่างที่ได้จากสถานที่เกิดเหตุ และตัวอย่างดีเอ็นเอจากอาสาสมัครให้เป็นตัวอย่างจากผู้ต้องสงสัย โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ STR จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ D8S1179, D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, vWA, TH01, CSF1PO และ D16S539 และนำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์ด้วยการแยกด้วยไฟฟ้าในตัวกลางอะครีลาไมด์เจล 8% พบว่าผลผลิต PCR ที่ได้จากเพิ่มปริมาณ STR 10 ตำแหน่ง จากตัวอย่างเลือดคน เส้นผม และน้ำลาย แสดงดังภาพที่ 4.11, 4.13 และ 4.15 ตามลำดับ จากภาพที่ 4.11 พบว่าผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของเลือดจากผู้ต้องสงสัยและเลือดจากสถานที่เกิดเหตุตำแหน่งที่ D8S1179 ในผู้ต้องสงสัยคนที่ 1 นั้นพบ Allele 1-1 และ 1-2 (ภาพที่ 4.11 Lane 1) ในผู้ต้องสงสัยคนที่ 2 พบ Allele 1-3 และ 1-3 (ภาพที่ 4.11 Lane 2) ในผู้ต้องสงสัยคนที่ 3 พบ Allele 1-4 และ 1-5 (ภาพที่ 4.11 Lane 3) ในผู้ต้องสงสัยคนที่ 4 พบ Allele 1-6 และ 1-6 (ภาพที่ 4.11 Lane 4) ในผู้ต้องสงสัยคนที่ 5 พบ Allele 1-7 และ 1-8 (ภาพที่ 4.11 Lane 5) และในตัวอย่างเลือดจากสถานที่เกิดเหตุพบ Allele 1-7 และ 1-8 (ภาพที่ 4.11 Lane 6) สำหรับผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของเลือดจากผู้ต้องสงสัยและเลือดจากสถานที่เกิดเหตุตำแหน่งที่ D5S818, D7S820, TPOX, D3S1358, D13S317, vWA, TH01, CSF1PO และ D16S539 แสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งผลที่ได้จากทุกตำแหน่งแสดงให้เห็นว่าเลือดที่พบในสถานที่เกิดเหตุตรงกับผู้ต้องสงสัยคนที่ 5

เนื่องจากมี Allele ทั้ง 10 STR loci ที่ตรงกัน และจากภาพที่ 4.13 และ 4.15 พบว่าผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ของเส้นผม และน้ำลายจากผู้ต้องสงสัยและเส้นผม และน้ำลายจากสถานที่เกิดเหตุ ทั้ง 10 ตำแหน่งให้ผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ที่ตรงกับผู้ต้องสงสัยคนที่ 5 ซึ่งวิธีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลนี้ สามารถใช้ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

ตารางที่ 4.5 รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ STR 10 ตำแหน่ง ของอาสาสมัคร 5 คน

STR loci*	Allele ที่พบ				
	อาสาสมัคร คนที่ 1	อาสาสมัคร คนที่ 2	อาสาสมัคร คนที่ 3	อาสาสมัคร คนที่ 4	อาสาสมัคร คนที่ 5
D8S1179	1-1, 1-2	1-3, 1-3	1-4, 1-5	1-6, 1-6	1-7, 1-8
D5S818	2-1, 2-1	2-3, 2-3	2-4, 2-5	2-6, 2-7	2-8, 2-8
D7S820	3-1, 3-1	3-2, 3-2	3-3, 3-4	3-5, 3-5	3-6, 3-6
TPOX	4-1, 4-1	4-2, 4-2	4-3, 4-3	4-4, 4-4	4-5, 4-5
D3S1358	5-1, 5-1	5-2, 5-2	5-3, 5-4	5-5, 5-5	5-6, 5-6
D13S317	6-1, 6-1	6-2, 6-2	6-3, 6-3	6-4, 6-5	6-6, 6-7
vWA	7-1, 7-1	7-2, 7-3	7-4, 7-5	7-6, 7-7	7-8, 7-9
TH01	8-1, 8-2	8-3, 8-4	8-5, 8-6	8-7, 8-8	8-9, 8-10
CSF1PO	9-1, 9-1	9-2, 9-2	9-3, 9-3	9-4, 9-4	9-5, 9-5
D16S539	10-1, 10-1	10-2, 10-2	10-3, 10-3	10-4, 10-4	10-5, 10-5

\* 10 STR loci: หมายเลขตัวแรกแทน STR แต่ละตำแหน่ง

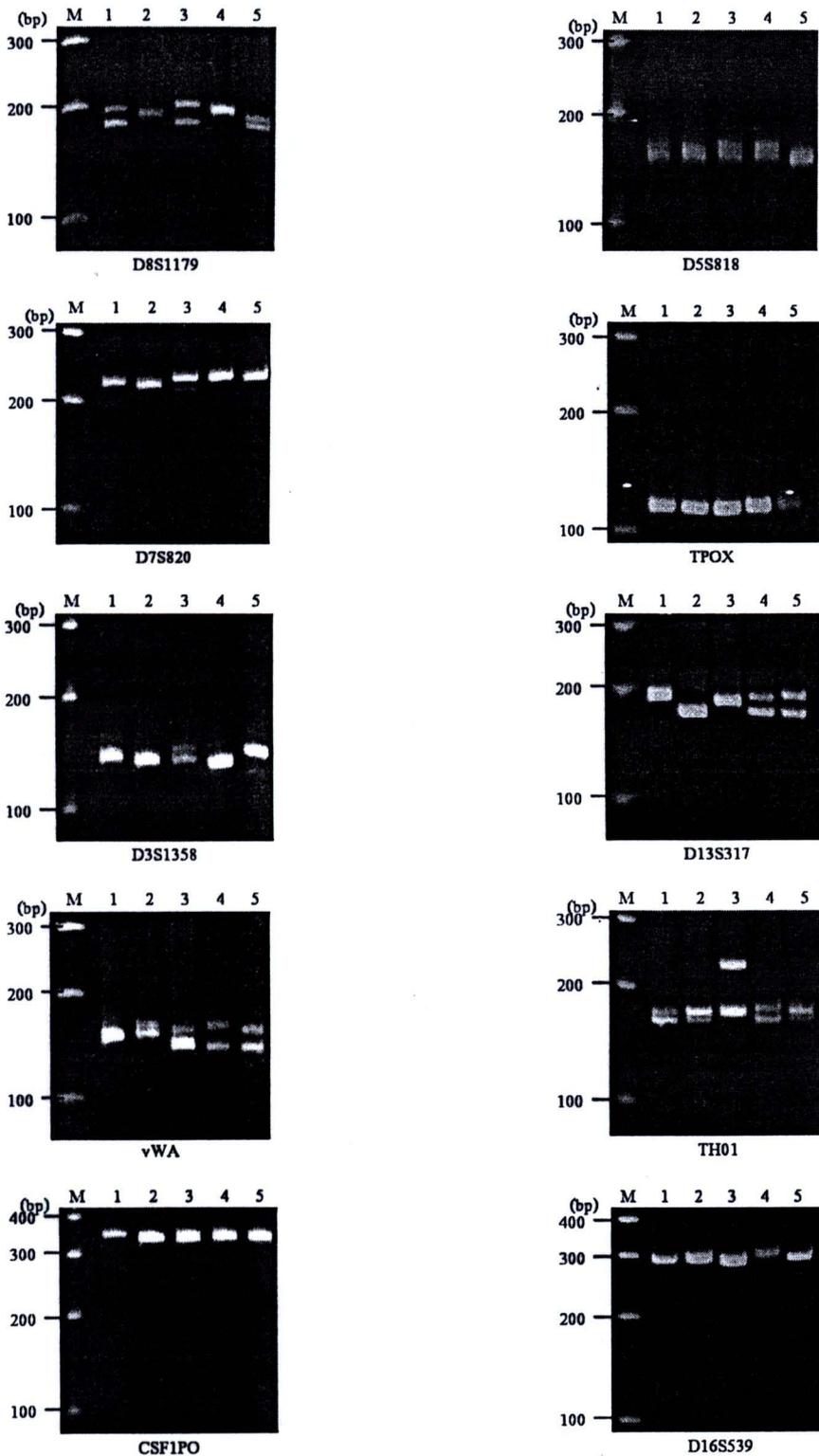
หมายเลขตัวที่สองแทน ขนาดของ PCR product แต่ละตำแหน่งที่พบ

ตารางที่ 4.6 รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ STR 10 ตำแหน่ง ของเลือดจากผู้ต้องสงสัย และจากสถานที่เกิดเหตุ

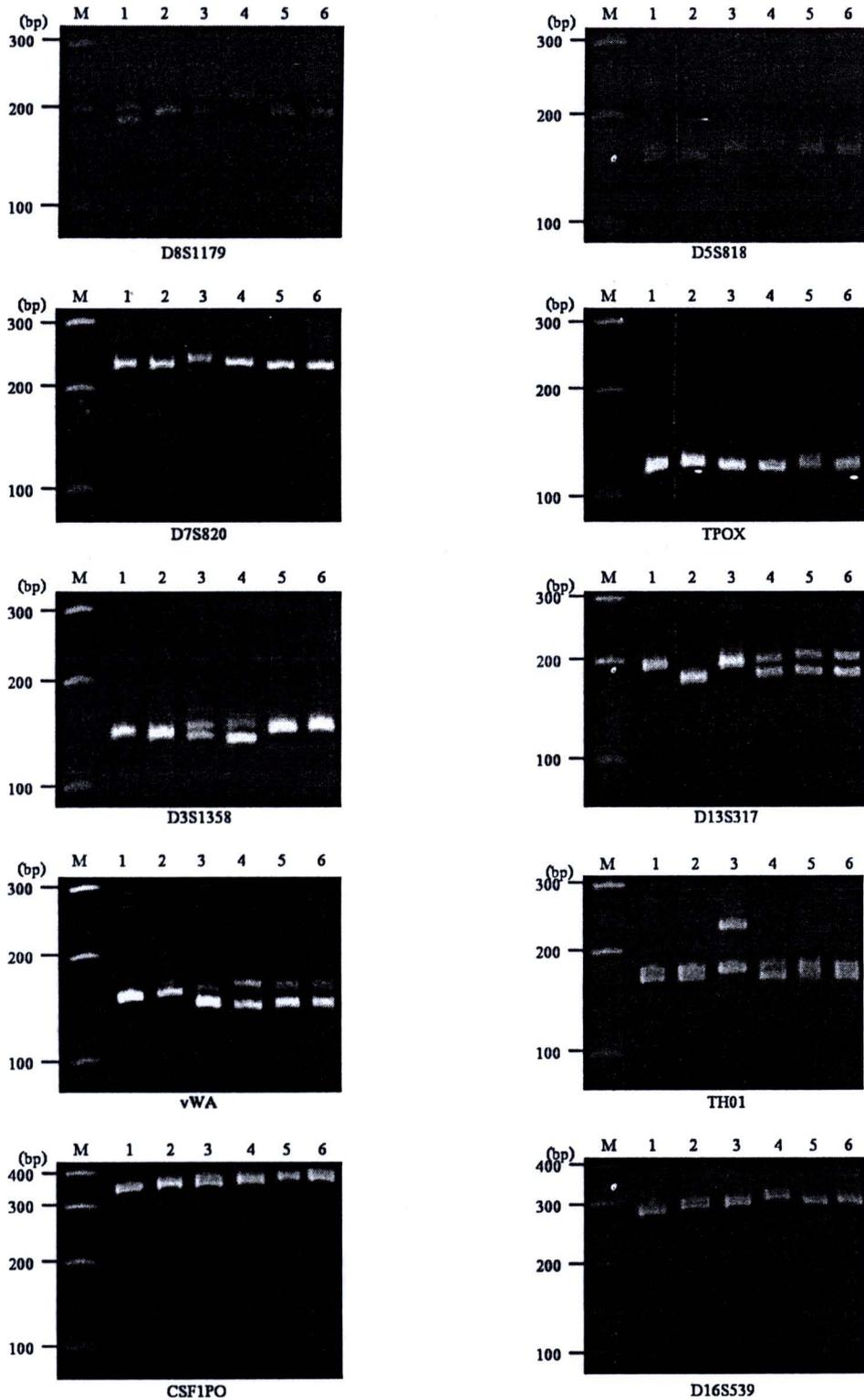
STR loci*	Allele ที่พบ					
	ผู้ต้อง สงสัย คนที่ 1	ผู้ต้อง สงสัย คนที่ 2	ผู้ต้อง สงสัย คนที่ 3	ผู้ต้อง สงสัย คนที่ 4	ผู้ต้อง สงสัย คนที่ 5	ตัวอย่าง จากสถานที่ เกิดเหตุ
D8S1179	1-1, 1-2	1-3, 1-3	1-4, 1-5	1-6, 1-6	1-7, 1-8	1-7, 1-8
D5S818	2-1, 2-1	2-3, 2-3	2-4, 2-5	2-6, 2-7	2-8, 2-8	2-8, 2-8
D7S820	3-1, 3-1	3-2, 3-2	3-3, 3-4	3-5, 3-5	3-6, 3-6	3-6, 3-6
TPOX	4-1, 4-1	4-2, 4-2	4-3, 4-3	4-4, 4-4	4-5, 4-5	4-5, 4-5
D3S1358	5-1, 5-1	5-2, 5-2	5-3, 5-4	5-5, 5-5	5-6, 5-6	5-6, 5-6
D13S317	6-1, 6-1	6-2, 6-2	6-3, 6-3	6-4, 6-5	6-6, 6-7	6-6, 6-7
vWA	7-1, 7-1	7-2, 7-3	7-4, 7-5	7-6, 7-7	7-8, 7-9	7-8, 7-9
TH01	8-1, 8-2	8-3, 8-4	8-5, 8-6	8-7, 8-8	8-9, 8-10	8-9, 8-10
CSF1PO	9-1, 9-1	9-2, 9-2	9-3, 9-3	9-4, 9-4	9-5, 9-5	9-5, 9-5
D16S539	10-1, 10-1	10-2, 10-2	10-3, 10-3	10-4, 10-4	10-5, 10-5	10-5, 10-5

\* 10 STR loci: หมายเลขตัวแรกแทน STR แต่ละตำแหน่ง

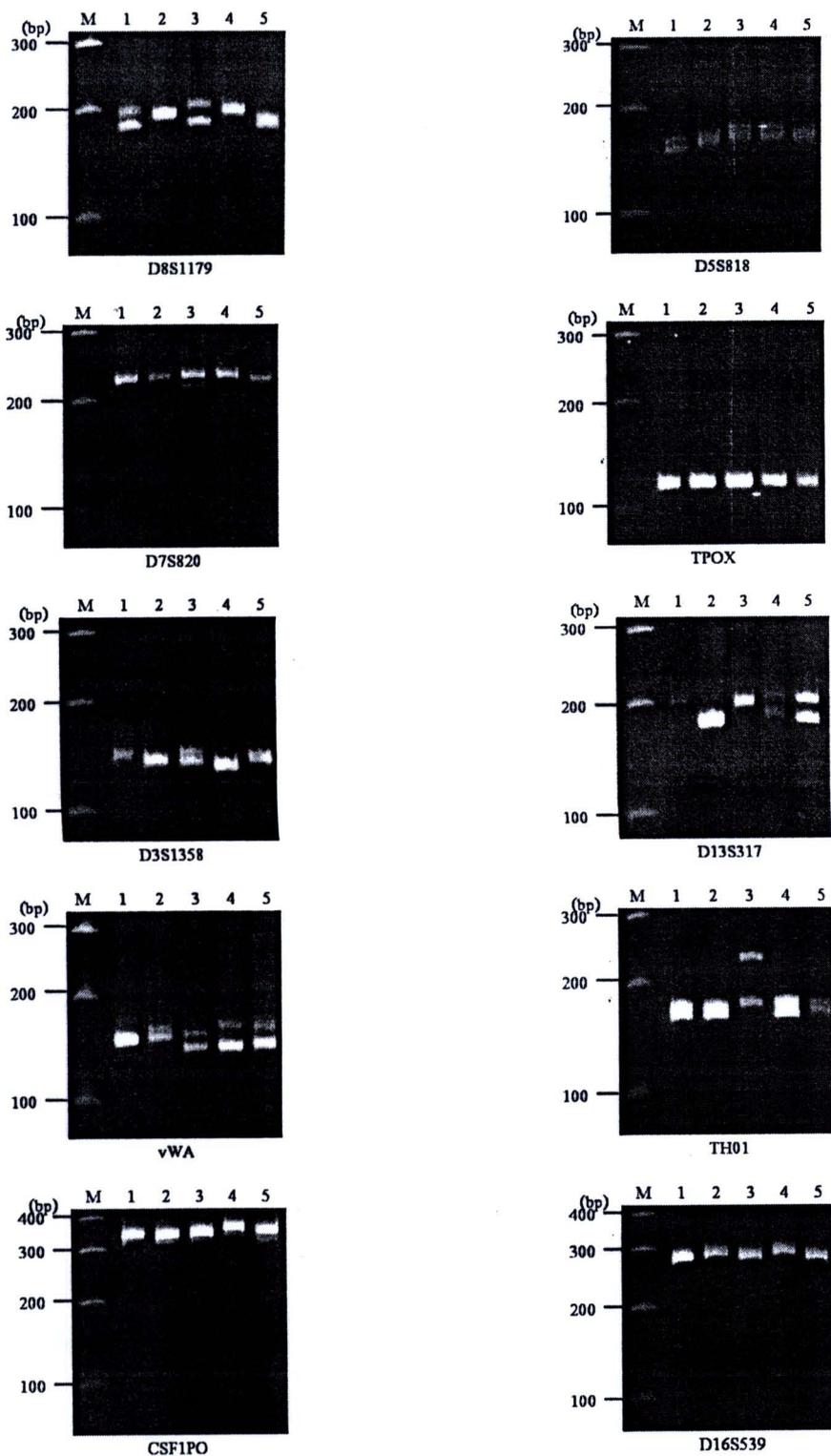
หมายเลขตัวที่สองแทน ขนาดของ PCR product แต่ละตำแหน่งที่พบ



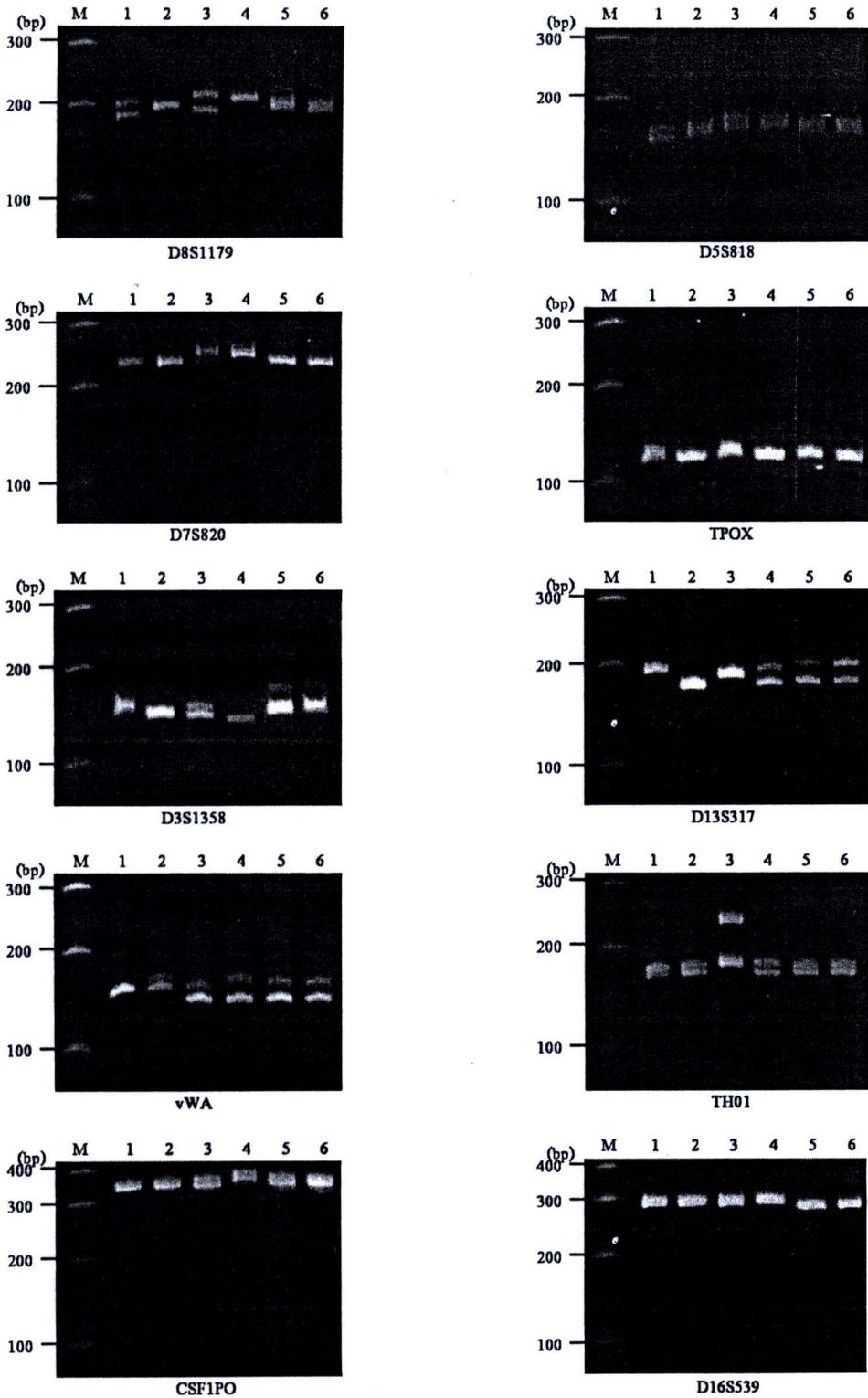
ภาพที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ STR 10 ตำแหน่ง จากเลือดของอาสาสมัคร 5 คน (Lane 1-5) เทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)



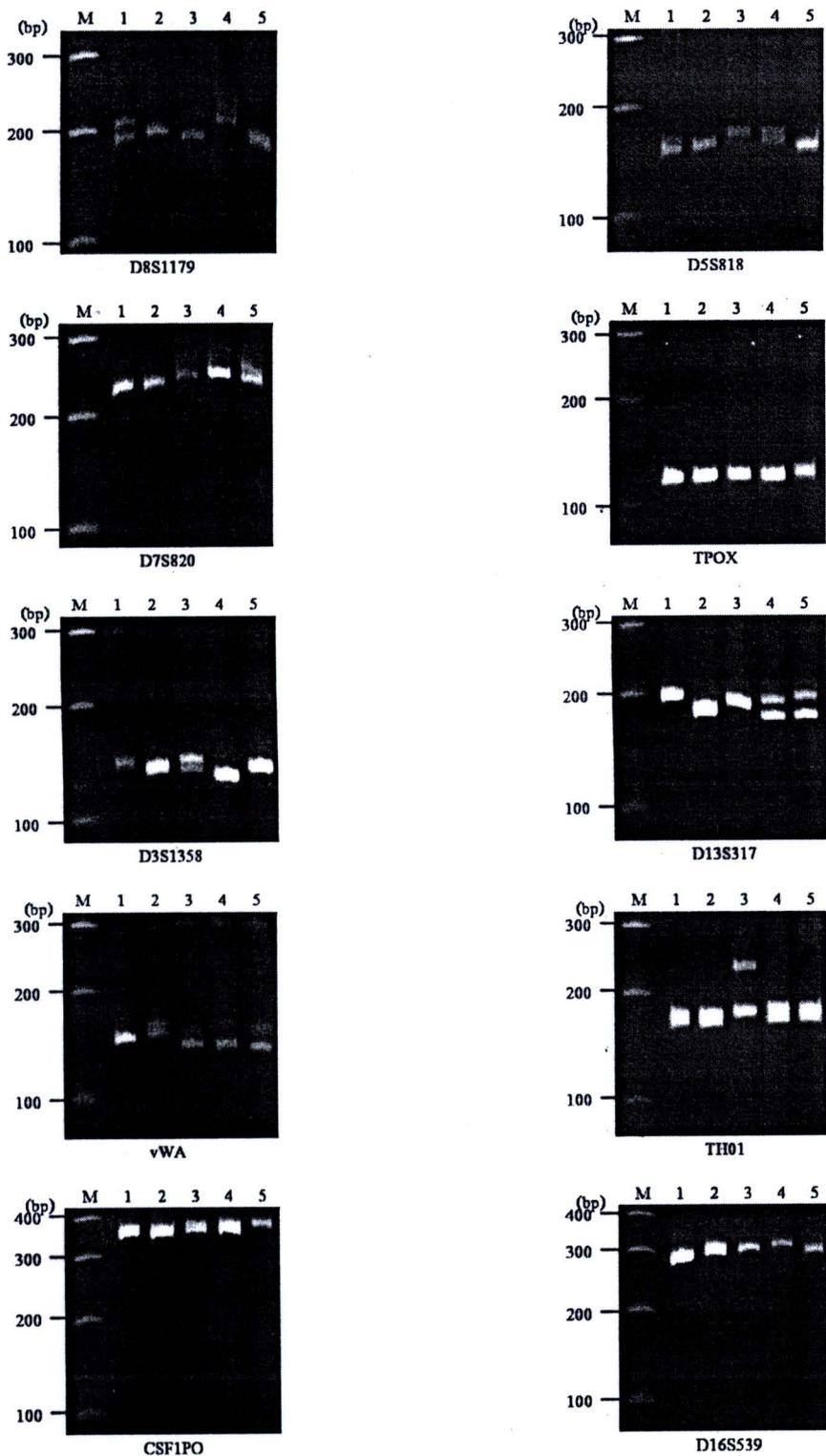
ภาพที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ STR 10 ตำแหน่ง จากเลือดของผู้ต้องสงสัย 5 คน (Lane 1-5) และเลือดจากสถานที่เกิดเหตุ (Lane 6) เทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)



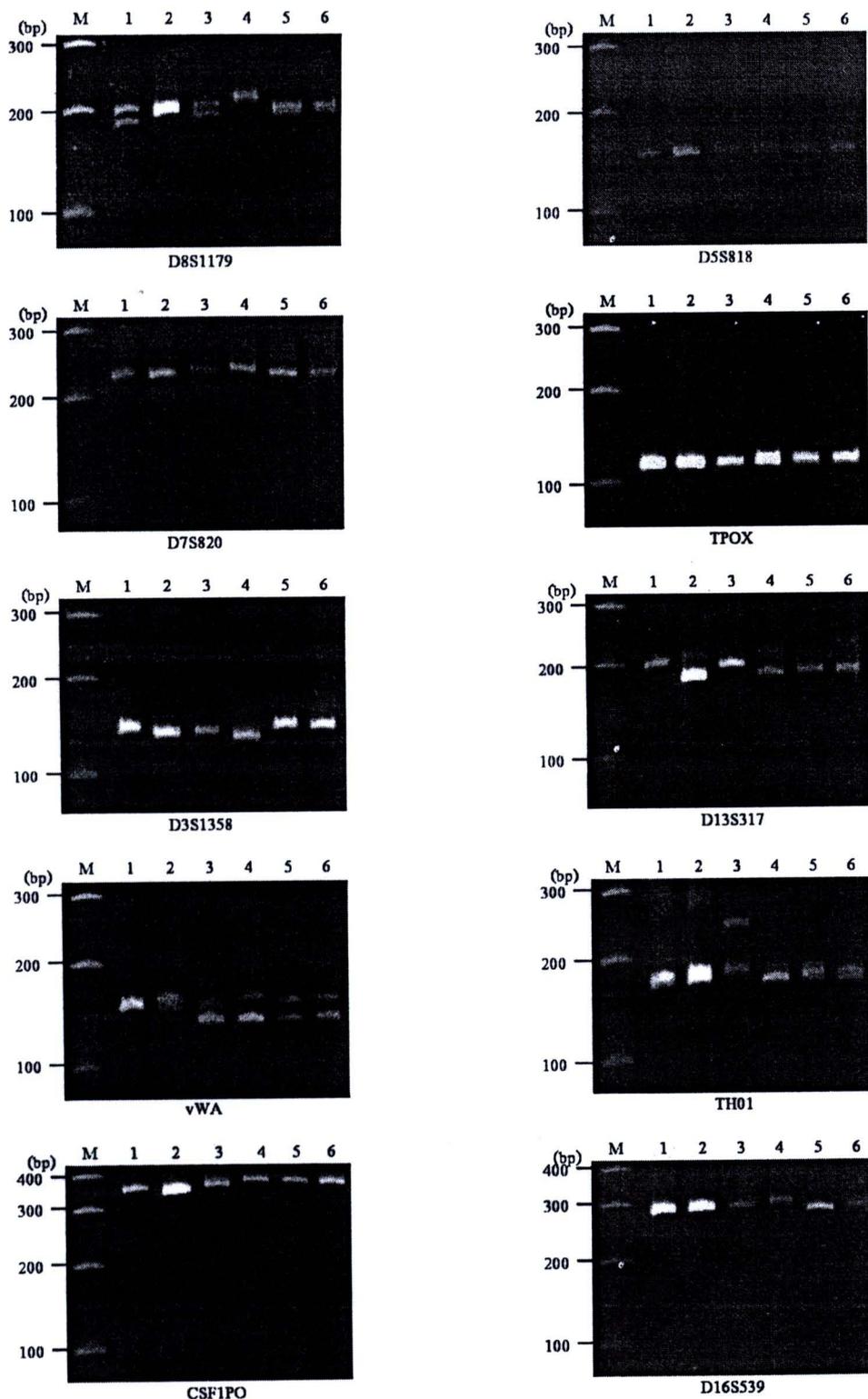
ภาพที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ STR 10 ตำแหน่ง จากเส้นผมของอาสาสมัคร 5 คน (Lane 1-5) เทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)



ภาพที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ STR 10 ตำแหน่ง จากเส้นผมของผู้ต้องสงสัย 5 คน (Lane 1-5) และเส้นผมที่เก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุ (Lane 6) เทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)



ภาพที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ STR 10 ตำแหน่ง จากน้ำลายของอาสาสมัคร 5 คน (Lane 1-5) เทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)



ภาพที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ STR 10 ตำแหน่ง จากน้ำลายของผู้ต้องสงสัย 5 คน (Lane 1-5) และน้ำลายที่เก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุ (Lane 6) เทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane M)