บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้

3.1.1 ตัวอย่างเลือดผู้บริจาคเลือดประจำของหน่วยคลังเลือด โรงพยาบาลรามาธิบดี จำนวน 40 ราย

3.1.2 ดีเอ็นเออ้างอิงที่ทราบชนิดของ HPA-7 ถึง 13 โดยวิธี sequence-base typing

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดผู้บริจาครายละ 10 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มล. ที่บรรจุน้ำยากันเลือดแข็งชนิด 5%EDTA pH 7.4 ปริมาตร 2 มล.

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดที่เก็บได้มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค modified salting-out เพื่อตกตะกอนโปรตีนด้วย NaCl แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย alcohol ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) เทตัวอย่างเลือดผู้บริจาค ปริมาตร 10 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มล.
2) ใส่น้ำยา red cell lysis buffer (RCLB) ปริมาตร 40 มล. ลงในหลอดตัวอย่างเลือดเพื่อสลายเม็ดเลือดแดงโดยเขย่าให้เข้ากัน
3) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 1,800 รอบ/นาที นาน 10 นาที
4) เทส่วนใสทิ้ง
5) นำตะกอนดีเอ็นเอ (pellet) ที่เหลือไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มล. ที่บรรจุน้ำยา RCLB ปริมาตร 12 มล. อยู่ภายในหลอด
6) ใช้ wide-tipped transfer pipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้ pellet กระจายออก แล้วเขย่าหลอดทดลองแบบกลับหัวขึ้น-ลง นานประมาณ 1 นาที
7) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 1,800 รอบ/นาที นาน 10 นาที
8) เทส่วนใสทิ้ง
9) ใส่ 5X proteinase K buffer ปริมาตร 160 มล. proteinase K ปริมาตร 40 ไมโครลิตร SDS 40 ไมโครลิตร และ dH_2O ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงใน

หลอดทดลอง แล้วใช้ wide-tipped transfer pipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้ pellet กระจายตัว

10) ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ปิดฝาหลอดแล้วปิดทับด้วย paraffilm อีกครั้ง

11) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55° ซ. พร้อมกับเขย่าเบาๆ นานประมาณ 2-4 ชม. จนกระทั่ง pellet ถูกย่อยจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน ในขั้นตอนนี้เมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 1 ชม. ให้ใส่ proteinase K เพิ่มอีก 20 ไมโครลิตร

12) นำหลอดทดลองมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วใส่สารละลาย 6M NaCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

13) เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันนานประมาณ 15-30 วินาที

14) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 12 นาที

15) ดูดส่วนใสใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที

16) ดูดส่วนใสใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที

17) ดูดส่วนใสปริมาตร 450 ไมโครลิตรใส่ microcentrifuge tube จำนวน 2 หลอด

18) ใส่ absolute ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทั้งสอง

19) เขย่าหลอดขึ้น-ลง เบาๆ จนกระทั่งดีเอ็นเอตกตะกอน

20) ดูดตะกอนดีเอ็นเอจากทั้งสองหลอดใส่ใน microcentrifuge tube ที่บรรจุ 70% ethanol อยู่

21) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที

22) ดูด 70% ethanol ทิ้ง ตั้งหลอดไว้จนกระทั่งตะกอนดีเอ็นเอแห้ง

23) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย sterile dH_2O

24) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ optical density (OD) 260 และ 280 นาโนเมตร (ดีเอ็นเอที่เหมาะสมควรมี OD_{260}/OD_{280} ratio ระหว่าง 1.65-1.8)

25) ปรับดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 100-150 ngDNA/µl

<u>ข้อควรระวัง</u> อุปกรณ์และสารเคมีทุกอย่างที่ใช้ต้องปราศจากเชื้อ และต้องสวมถุงมือยางทุกขั้นตอน

3.2.3 **การเตรียมไพรเมอร์**

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนHPA-7 ถึง HPA-13 มาจากรายงานวิจัยของ Jau YL และคณะ (Jau YL, Ying JC, Hui YH และคณะ 2002) (ดังแสดงในตารางที่ 5) แบ่งออกเป็น 2 ชุด ได้แก่

1) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอัลลีนของยีน HPA (HPA primer) แต่ละระบบประกอบด้วยไพรีเมอร์ 3 เส้น ได้แก่

- upstream primers เป็นเส้นที่จำเพาะกับอัลลีน a หรือ b ของยีนHPA แต่ละระบบ จำนวน 2 เส้น ได้แก่ HPA-a และ HPA-b
- downstream primer เป็นเส้นที่จำเพาะกับระบบของยีน HPA จำนวน 1 เส้น ได้แก่ HPA-AS

2) ไพรเมอร์ควบคุมระบบ (internal control primer) เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน C-reactive protein (CRP) ซึ่งเป็น human growth hormone (HGH) ที่พบในทุกคน ได้แก่ upstream (HGH-A) และ downstream (HGH-AS) ใช้เป็นตัวควบคุมระบบการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

<u>ขั้นตอนการเตรียม</u>

1) เตรียมไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน HPA แต่ละระบบทั้ง upstream และ downstream ให้มีความเข้มข้น 8 µM
2) เตรียมไพรเมอร์ควบคุมทั้ง upstream และ downstream ให้มีความเข้มข้น 3 µM
3) เตรียมส่วนประกอบของไพรเมอร์สำหรับยีน HPA แต่ละระบบๆ ละ 2 ชุด เพื่อตรวจหาอัลลีน a และอัลลีน b โดยแต่ละชุดประกอบด้วย

- upstream primer ของอัลลีน a หรือ b (HPA-A)	100	µl
- downstream primer ของระบบ (HPA-AS)	100	µl
- upstream primer ของ internal control (HGH-A)	100	µl
- downstream primer ของ internal control (HGH-AS)	100	µl
- sterile dH2O	600	µl

ผสมส่วนประกอบของไพรเมอร์ทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 30° ซ.

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการตรวจหายีน HPA-7 ถึง 13 (Jau YL, Ying JC, Hui YH *et al.* 2002)

Primer code	Primer sequence 5' → 3'	Gene	Position ** (5')	Size of PCR product (bp)
HPA-7a	GCC AAG GTG CGA GGC TGT C	GPIIIa	1299	209
HPA-7b	GCC AAG GTG CGA GGC TGT G		1299	209
HPA-7AS	TGG GAT CCC AGC CAG CCA G		1507	
HPA-8a	ACT GAC TCA ATC TCG TCA CG	GPIIIa	2023	190
HPA-8b	CAC TGA CTC AAT CTC GCT ACA		2024	191
HPA-8AS	*GGT GGA GCA GCT TTC TGA ATG*		1934 (-100)	
HPA-9a	GGG CAG CCC CCA GTC CAC	GPIIb	2620	212
HPA-9b	GGG CAG CCC CCA GTC CAT		2620	212
HPA-9AS	GAC CTG CTC TAC ATC CTG GA		2525	
HPA-10a	TCC CAG TGA GTG AGG CCC G	GPIIIa	265	216
HPA-10b	TCC CAG TGA GTG AGG CCC A		265	216
HPA-10AS	*CTG AGC TAC TTC CCC AAG AC*		381 (+99)	
HPA-11a	TGA CGA AAA TAC CTG CAA CCG	GPIIIa	1976	184
HPA-11b	TGA CGA AAA TAC CTG CAA CCA		1976	184
HPA-11AS	GCA CAA CAT TCC CTG AGG TA		2159	
HPA-12a	GAC GCT CGT GGA CTG CGG	GPIbβ	129	194
HPA-12b	GAC GCT CGT GGA CTG CGA		129	194
HPA-12AS	GCA CAA GGC GGC AGT CGC		317	
HPA-13a	CAA AAG GTT AAC ATT TTC AGT AAC	GPIa	2508	115
HPA-13b	CAA AAG GTT AAC ATT TTC AGT AAT		2508	115
HPA-13AS	*TAC* CGG TAG GGA GAA TGA TGC		2619 (+3)	
HGH-S	TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A			434
HGH-AS	CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC			434

AS = antisense, Intronic bases (in italics) located downstream (+) or upstream (-) of the polymorphic exons are indicated. The numbering of primers is based on published cDNA sequences.

* = The position of the first 5' nucleotide of primers.

3.2.4 **การเตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Preparation of PCR solution)**

สารประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR solution) โดยวิธี PCR-SSP สำหรับตรวจหายีน HPA-7 ถึง 13 ประกอบด้วย $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนั้น เพื่อความสะดวกในการใช้งานจึงแยกเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (10 X PCR buffer) เป็น 2 หลอด (ดังแสดงในภาคผนวก) ได้แก่ หลอดที่ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 15 mM ใช้สำหรับ HPA-7 ถึง 12 และหลอดที่ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 25 mM ใช้สำหรับ HPA-13 เพื่อนำมาเตรียมเป็น PCR solution ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1) นำส่วนประกอบทั้งหมดของ PCR solution แต่ละชุดใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

- 10 X PCR buffer (with 15 or 25 $MgCl_2$)	ปริมาตร	250	µl
- 99.5% glycerol	ปริมาตร	125	µl
- 100 mM dNTPs	ชนิดละ	5	µl
- 10 mg/ml Cresol red	ปริมาตร	25	µl
- Sterile dH_2O	ปริมาตร	330	µl

2) เขย่าส่วนประกอบให้เข้ากัน

3) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที

4) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ ได้นานประมาณ 2 สัปดาห์

3.2.5 **ขั้นตอนการเตรียมส่วนประกอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Procedure-Preparation of PCR reaction mixtures)**

เป็นขั้นตอนในการนำส่วนประกอบของสารละลายต่างๆ ที่เตรียมไว้ในตอนต้นมาเตรียมเป็นส่วนประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ HCG เป็น internal control เพื่อควบคุมระบบของการทดลองและใช้ดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของยีน HPA-7 ถึง 13 และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลการทดลอง ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) เขียนตัวเลขกำกับ strip-PCR tube สำหรับตรวจ HPA แต่ละระบบๆ ละ 2 หลอดทดลอง สำหรับอัลลีน a และ b จนครบทั้ง 7 ระบบ และสำหรับตัวควบคุมชนิดลบ (negative control) อีก 2 หลอด สำหรับทั้งอัลลีน a และ b ของการตรวจหาบีนระบบใดก็ได้
2) ดูดไพรเมอร์สำหรับบีน HPA แต่ละระบบ อัลลีนละ 5 µl ลงใน strip-PCR tube ให้ตรงกับที่เขียนกำกับไว้

<u>หมายเหตุ</u> ชุดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจนี้สามารถเตรียมไว้ล่วงหน้า โดยปิดฝาให้สนิท และเก็บแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ.

3) เขียนความเข้มข้นของ $MgCl_2$ กำกับ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จำนวน 2 หลอด หลอดที่ 1 เขียน "1.5 mM" สำหรับเตรียมส่วนประกอบก่อนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR pre-mixture/master-mixture) ของ HPA-7 ถึง 12 และหลอดที่ 2 เขียน "2.5 mM" สำหรับ HPA-13
4) ดูดส่วนประกอบของ PCR solution และ Ampli Taq Gold® polymerase ลงใน microcentrifuge tube ที่เตรียมไว้ในข้อ 3 โดยคำนวณตามจำนวนตัวอย่างที่ต้องการตรวจ (ดังตารางที่ 6) หลอดที่เขียน "1.5 mM" เตรียมทั้งหมด 12 reaction/ดีเอ็นเอ 1 ราย (สำหรับตรวจหาบีน HPA-7 ถึง 12 จำนวน 6 ระบบๆ ละ 2 reaction) และหลอดที่เขียน "2.5 mM" เตรียมทั้งหมด 2 reaction/ดีเอ็นเอ 1 ราย (สำหรับตรวจหาบีน HPA-13 ทั้ง 2 อัลลีน) โดยใช้
   - PCR solution ปริมาตร 2.9 µl/reaction
   - Ampli Taq Gold® polymerase ปริมาตร 0.1 µl/reaction
5) เขย่าส่วนประกอบให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที
6) นำส่วนประกอบที่เตรียมได้จากข้อ 5 ใส่ในชุดของไพรเมอร์ที่เตรียมไว้ หลอดละ 3 µl (หลอดที่เขียนกำกับ "1.5 mM" ใส่ในชุดไพรเมอร์สำหรับ HPA-7 ถึง 12 และหลอดที่ 2 เขียน "2.5 mM" ใส่ในชุดของไพรเมอร์ HPA-13)
7) ใส่ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 100 – 150 ng/µl ลงไปหลอดสำหรับตรวจหาบีน HPA-7 ถึง 13 หลอดละ 2 µl และใส่ dH_2O ลงในหลอดควบคุมชนิดลบหลอดละ 2 µl
8) ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท แล้วนำไปใส่ในเครื่อง thermal cycle เพื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทันที

ตารางที่ 6 แสดงการเตรียม PCR master-mixture ตามจำนวนของตัวอย่างที่ใช้ตรวจ

จำนวนตัวอย่าง (ราย)	หลอดที่1 ("15mM") (สำหรับตรวจหายีน HPA-7 ถึง 12)		หลอดที่2 ("2.5mM") (สำหรับตรวจหายีน HPA-13)	
	ปริมาตรของส่วนประกอบที่ต้องใช้ (µl)		ปริมาตรของส่วนประกอบที่ต้องใช้ (µl)*	
	PCR solution with 15 mM $MgCl_2$	Ampli Taq Gold®	PCR solution with 25 mM $MgCl_2$	Ampli Taq Gold®
1	2.9 x 12 = 34.8	0.1 x 12 = 1.2	2.9 x 4 = 11.6	0.1 x 4 = 0.4
2	2.9 x 24 = 69.6	0.1 x 24 = 2.4	2.9 x 6 = 17.4	0.1 x 6 = 0.6
3	2.9 x 36 = 104.4	0.1 x 36 = 3.6	2.9 x 8 = 23.2	0.1 x 8 = 0.8
4	2.9 x 48 = 139.2	0.1 x 48 = 4.8	2.9 x 10 = 29	0.1 x 10 = 1.0
5	2.9 x 60 = 174	0.1 x 60 = 6.0	2.9 x 12 = 34.8	0.1 x 12 = 1.2

* คำนวณเพื่อใช้สำหรับตัวอย่างควบคุมชนิดลบเพิ่มอีก 2 reactions

ตารางที่ 7 สรุปส่วนประกอบของ PCR mixture/reaction ที่ใช้ในการตรวจหายีน HPA

ระบบยีน	ความเข้มข้นสุดท้าย					
	HPA primer (µM/each)	HGH primer (µM/each)	$MgCl_2$ (mM)	dNTPs (µM/each)	AmpliTaq® Gold (unit)	DNA (ng)
HPA-7 ถึง12	0.40	0.15	1.5	200	0.5	200 - 300
HPA-13	0.40	0.15	2.5	200	0.5	200 - 300

3.2.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยวิธี PCR-SSP

3.2.6.1 หลักการ

ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้สามารถจับกับตำแหน่งของเบสที่จำเพาะต่ออัลลีนนั้นๆ ได้อย่างสมบูรณ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา จะทำให้เกิดสัญญาณให้เห็นได้อย่างชัดเจน (ผลบวก) ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะจะไม่ปรากฏสัญญาณขึ้นมาให้เห็น (ผลลบ) สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยขบวนการอิเลคโตรโฟเรสิส (electrophoresis) ทำให้ส่วนของยีนที่ถูกขยายขึ้นมาปรากฏอยู่บนแผ่นวุ้นที่มี ethidium bromide ผสมอยู่ เมื่อใช้แสงอุลตราไวโอเลตจึงทำให้มองเห็นแถบของดีเอ็นเอที่ถูกขยายขึ้นมาได้

3.2.6.2 **ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ**

นำส่วนประกอบของ PCR mixture ที่เตรียมได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเครื่อง thermo cycle (PTC-100 TM, MJ Research, Inc., U.S.A.) ที่ได้กำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาไว้ ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยแยกทำ 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่1 สำหรับตรวจหายีน HPA-7 ถึง 12 และชุดที่ 2 สำหรับตรวจหายีน HPA-13 แต่ละชุดการทดลองจะใช้เวลาทั้งหมด 2 ชั่วโมง 10 นาที

ตารางที่ 8 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		เวลา	จำนวนรอบ
	ชุดที่ 1 (HPA-7 ถึง 12)	ชุดที่ 2 (HPA-13)		
Denaturation	95	95	11 นาที	1
Denaturation	95	95	30 วินาที	32
Annealing	61	59	50 วินาที	
Extention	72	72	30 วินาที	
Holding	4	4	5 นาที	1

3.2.6.3 **ขั้นตอนการตรวจหาผลผลิตของดีเอ็นเอ**

ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองจะถูกนำไปตรวจหาแถบที่เกิดขึ้นโดยการเทลงในตัวกลาง 2% agarose gel ที่มี ethidium bromide ผสมอยู่ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100-volt โดยมี 0.5X TBE เป็นบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 12 นาที จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพเพื่อนำมาวิเคราะห์ผลการทดลองต่อไป

3.3 การอ่านและการแปลผล

การอ่านผล

การอ่านผลการตรวจโดยวิธี PCR-SSP จะพิจารณาที่ความน่าเชื่อถือและความถูกต้องของการทดลองโดยพิจารณา

- **ความน่าเชื่อถือ** จากแถบของตัวควบคุมภายในระบบ (internal control band) โดยระบบของการทดลองที่เหมาะสมและน่าเชื่อถือจะต้องปรากฏแถบของ internal control ให้เห็น แต่ในกรณีที่แถบของอัลลีนที่จำเพาะกับยีน HPA มีความเข้มของแถบมาก อาจทำให้แถบของ internal conrol ในหลอดทดลองนั้นจางหรือหายไป ก็ได้ แต่ต้องพบแถบของ internal control ในหลอดทดลองของอัลลีนที่คู่กัน และในหลอดที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) จะต้องไม่ปรากฏแถบใดๆ ขึ้นมาให้เห็น แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องจนทำให้เกิดผลบวกปลอม (fault positive/non-specific) ขึ้น

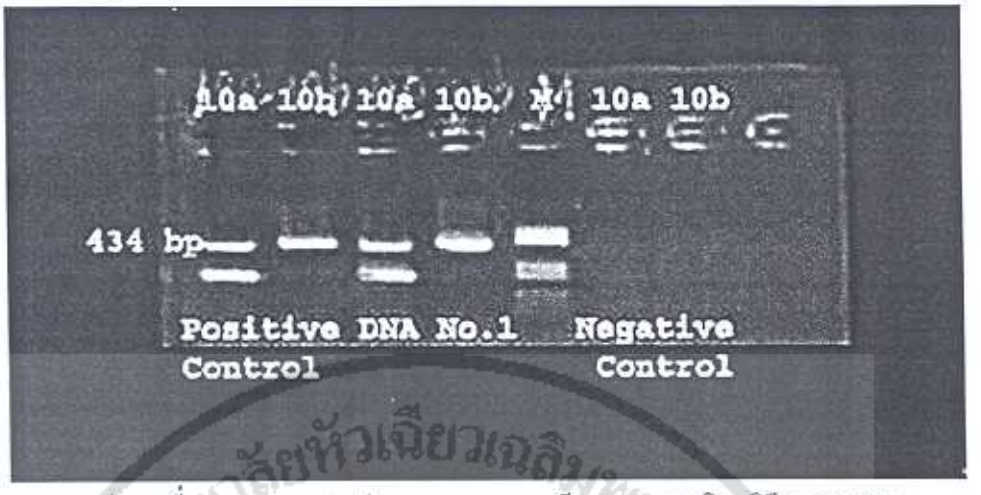
- **ความถูกต้อง** จากแถบของยีนที่จำเพาะกับตำแหน่งของอัลลีนนั้น (specific band) โดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบชนิดของยีนของแอนติเจน HPA-7 ถึง 13 เป็นตัวตรวจสอบความถูกต้องเทียบกับ molecular weight marker ที่ใช้ในการบอกตำแหน่งของดีเอ็นเอ

ผลบวก จะพบแถบของ internal control และ แถบของยีนที่จำเพาะต่ออัลลีนนั้น

ผลลบ จะพบเฉพาะแถบของ internal control

การแปลผล

ดีเอ็นเอที่มียีน HPA ที่มีอัลลีนที่จำเพาะกับไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ เมื่อถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต จะปรากฏแถบของ internal control และ specific ให้เห็น แสดงว่า คนนั้นมีอัลลีนของยีน HPA นั้น ในการแปลผลจะพิจารณาจากแถบของยีนที่ปรากฏจากการทดลองทั้งสองอัลลีน ถ้าปรากฏเพียง 1 อัลลีน แสดงว่าคนๆ นั้นมียีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดระบบนั้นเป็นแบบโฮโมไซกัส เช่น HPA-7a,a และ HPA-7b,b เป็นต้น แต่ถ้าพบแถบของยีนปรากฏทั้งสองอัลลีน แสดงว่า คนๆ นั้นมียีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดระบบนั้นเป็นแบบเฮทเทอโรไซกัส เช่น HPA-7a,b หรือ และ HPA-8a,b เป็นต้น



รูปภาพที่ 4 แสดงการแปลผลการตรวจหายีน HPA-10 โดยวิธี PCR-SSP

จากรูป ดีเอ็นเอหมายเลข 1 (DNA No.1) มีเฉพาะอัลลีน a ของยีน HPA-10 ดังนั้น จึงมีจีโนทัยป์ของระบบนี้เป็น HPA-10a,a เหมือนกับตัวอย่างควบคุมชนิดบวก (positive control) และผลการทดลองที่เกิดขึ้นมีความน่าเชื่อถือได้ เนื่องจากพบแถบของ internal control (434 bp) ทั้ง 4 หลอด และในหลอดควบคุมชนิดลบก็ไม่ปรากฏแถบใดๆ ขึ้นมา แสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม ทำให้เชื่อได้ว่าแถบของผลบวกที่เกิดขึ้นเป็นแถบของอัลลีนของยีน HPA ที่จำเพาะกับไพรเมอร์นั้นจริง