บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการนำวิธีติดฉลากด้วยสารเคมีมาใช้แทนการติดฉลากด้วยสารรังสี สำหรับใช้ตรวจสอบโรคทางพันธุกรรมเช่นธาลัสซีเมีย โดยได้ทำการสกัดโครโมโซมจากเม็ดเลือดขาวของอาสาสมัครคนปกติและผู้ป่วยที่มาทำการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ วิธีการสกัดโครโมโซมที่ใช้สามารถสกัดโครโมโซมได้ในปริมาณ 0.3-0.5 มก.ต่อเลือด 10 มล.ทั้งนี้แล้วแต่ปริมาณเม็ดเลือดขาว บางตัวอย่างมีเม็ดเลือดขาวน้อยก็จะทำให้ได้โครโมโซมน้อยด้วย อย่างไรก็ตามปริมาณที่สกัดได้ก็เพียงพอต่อการทดลอง เพราะถูกนำมาใช้ในการ blot เพียงครั้งละ 5 ไมโครกรัม ส่วนมากอุปสรรคที่มีต่อการทดลองมักเกิดจากการปนเปื้อนของสาร phenol ที่ใช้ในการทำให้โครโมโซมสะอาด และทำให้โครโมโซมไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ปัจจุบันพบว่ามีบางบริษัทได้ผลิตสารเคมีสำเร็จรูปซึ่งสามารถใช้ในการเตรียมโครโมโซมโดยไม่ต้องมีการทำ phenol extraction แต่ยังมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นในการตรวจสอบนี้ปัจจัยเบื้องต้นก็มาจากความสามารถในการสกัดโครโมโซมที่ดีด้วย ในการติดฉลากด้วยสารเคมี เรามีวัตถุประสงค์เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารอันตราย ทำให้ผู้ทำการทดสอบซึ่งมักเป็นงานที่ต้องทำประจำไม่มีความเสี่ยงอันเนื่องมาจากการทำงาน แต่การใช้สารเคมีมีข้อด้อยเรื่องความไวของการตรวจสอบ ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ biotin และ DIG ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในงานการทดลองอื่นๆ และมีรายงานว่ามีความไวต่อการทดสอบ แต่ DIG จะมีราคาแพงกว่า ผลการทดลองปรากฏว่าการติดฉลากด้วยDIG สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการไฮบริไดซ์ของดีเอ็นเอตรวจจับซึ่งในที่นี้เป็นยีนของ δ และโครโมโซมที่ถูกตัดด้วย *Hin*fI ได้เช่นเดียวกับการใช้สารรังสี แม้การทดลองครั้งนี้จะไม่ได้เปรียบเทียบเชิงปริมาณโดยตรงว่าสารรังสีหรือ DIG จะให้ผลที่ไวกว่ากัน แต่ด้วยวิธีการและปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในแต่ละการทดลองไม่แตกต่างไปจากการทดลองที่ใช้สารรังสี ทำให้สรุปได้ว่าการติดฉลากด้วยสารรังสีหรือ DIG ต่างมีความไวที่ใกล้เคียงกัน ส่วน background ที่เห็นค่อนข้างสูง ก็สามารถแก้ไขได้โดยเพิ่มขั้นตอน washing ให้นานและมากขึ้นก็จะช่วยขจัด background ไปได้มาก จากการศึกษายังพบว่า DIG จะให้ผลที่มี background น้อยกว่าการใช้ biotin ผู้ทำการวิจัยยังได้เปลี่ยนวิธีการทดลองในข้อ 2 หน้า 14 ไปจากที่ระบุไว้ตามวิธีที่บริษัทแนะนำคือแทนที่จะบ่มในสารละลายที่ 2 ที่ 65 °C ก็เปลี่ยนมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนั้นวิธีการไฮบริไดเซชั่นในตอนแรกได้ใช้สารละลาย Denhardt's solution,

freshly denatured sheared herring sperm DNA และ dextran sulfate ก็เปลี่ยนมาเป็น blocking solution ที่บริษัท Boehringer Mannheim ผลิตแทน เพราะทำให้ background ต่ำกว่า

สำหรับตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่าในตอนแรกได้ใช้เลือดผู้ป่วย แต่ต่อมาเนื่องจากเห็นว่าเป็นการทดลองเพื่อปรับปรุงเทคนิคการตรวจสอบ จึงได้เปลี่ยนไปใช้เลือดคนปกติแทน ทั้งนี้เนื่องจากเลือดผู้ป่วยหายาก และการขอเลือดจากผู้ป่วยครั้งละมากๆก็เป็นการไม่เหมาะสมจึงได้เก็บตัวอย่างไว้ทดสอบภายหลังที่วิธีการนี้ได้ผลเสียก่อน และจากผลจากการทดลองนี้ทำให้เราสามารถนำ DIG มาใช้ในงานวิเคราะห์แทนสารรังสี โดยในการตรวจสอบสามารถทำได้โดยเปรียบเทียบการเกิดหรือขนาดของแถบระหว่างโครโมโซมของคนปกติและผู้ป่วย และระบุได้ว่าผู้ป่วยเป็นโรคธาลัสซีเมียแบบใด