บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเตรียมโครโมโซมจากเลือดตัวอย่าง

ในการทดลองได้เตรียมโครโมโซมจากเลือดตัวอย่างของอาสาสมัครคนปกติจำนวน 3 ราย และเลือดผู้ป่วยเป็นอัลฟา-ธาลัสซีเมียจำนวน 43 ราย เลือดปริมาตร 10 มล. ถูกนำมาปั่นแยกเอาแต่เม็ดเลือดขาว และสกัดโครโมโซมจากเม็ดเลือดขาวตามวิธีที่ระบุไว้ในบทที่ 2 โครโมโซมที่ได้มีปริมาณระหว่าง 0.3 - 1 มก. ซึ่งเพียงพอต่อการทดลอง ตารางที่ 2 แสดงผลของการสกัดโครโมโซมจากตัวอย่างที่ได้ทั้งหมด

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณตัวอย่างโครโมโซมที่สกัด

ตัวอย่าง	ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/เลือด 10 มล.)	ตัวอย่าง	ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/เลือด 10มล.)
Normal 1	630	21	200
Normal 2	970	22	810
Normal 3	1160	23	60
1	230	24	190
2	170	25	140
3	190	26	220
4	200	27	240
5	320	28	90
6	280	29	90
7	100	30	50
8	160	31	40
9	190	32	220
10	50	33	130
11	40	34	30

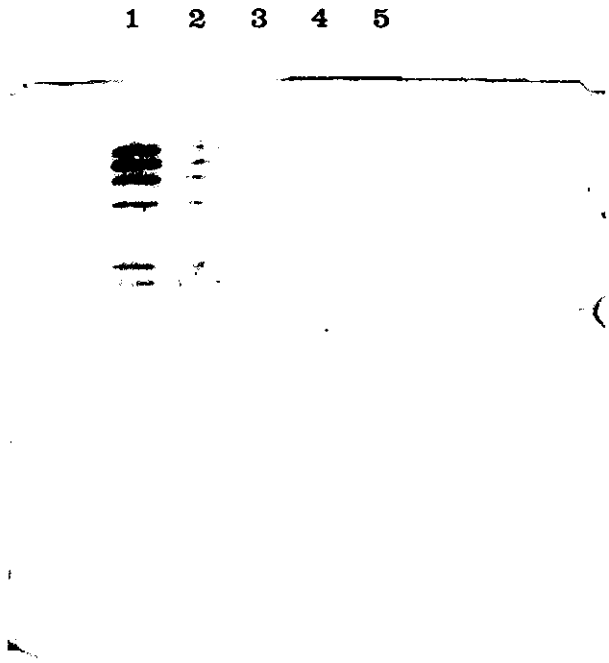
CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/เลือด 10 มล.)	ตัวอย่าง	ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/เลือด 10มล.)
12	210	35	275
13	60	36	180
14	40	37	100
15	250	38	310
16	120	39	130
17	190	40	50
18	120	41	20
19	100	42	210
20	50	43	140

2. การใช้ดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วย Biotin

เตรียมดีเอ็นเอตรวจจับจากพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนของ δ ขนาด 1.9 kb โดยตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แล้วแยกชิ้นส่วนขนาด 1.9 kb. ให้บริสุทธิ์ นำชิ้นส่วนนี้มาติดฉลากด้วย biotin และไฮบริไดซ์กับโครโมโซมจากเลือดตัวอย่างผู้ป่วยหมายเลข 1-15 ซึ่งตรึงอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ผลการทดลองพบว่าไม่ปรากฏแถบใดๆบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทั้งนี้อาจเกิดจากหลายสาเหตุเช่น การติดฉลากไม่ดี หรือ ขั้นตอนการไฮบริไดเซชั่นไม่เหมาะสม หรือการติดฉลากด้วยวิธีนี้มีความไวไม่เพียงพอต่อการตรวจสอบ จึงได้ทำการทดลองโดย blot เจลที่มีดีเอ็นเอของ λ-*Hin*dIII ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน และทำไฮบริไดเซชั่นกับ λ-DNA ที่ติดฉลากด้วยไบโอตินภายใต้สภาวะเดียวกับที่ใช้ในการทดลองกับโครโมโซมตัวอย่าง ผลปรากฏว่าเกิดแถบชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 2 แต่แถบจะปรากฏก็ต่อเมื่อใช้ปริมาณของ λ-*Hin*dIII มากกว่า 0.2 ไมโครกรัม แสดงว่าวิธีการตรวจสอบโดยติดฉลากดีเอ็นเอตรวจจับด้วย biotin ภายใต้สภาวะที่ทดลองในครั้งนี้ไม่ไวพอ จึงได้เปลี่ยนวิธีติดฉลากใหม่โดยใช้สารเคมีดังหัวข้อต่อไป

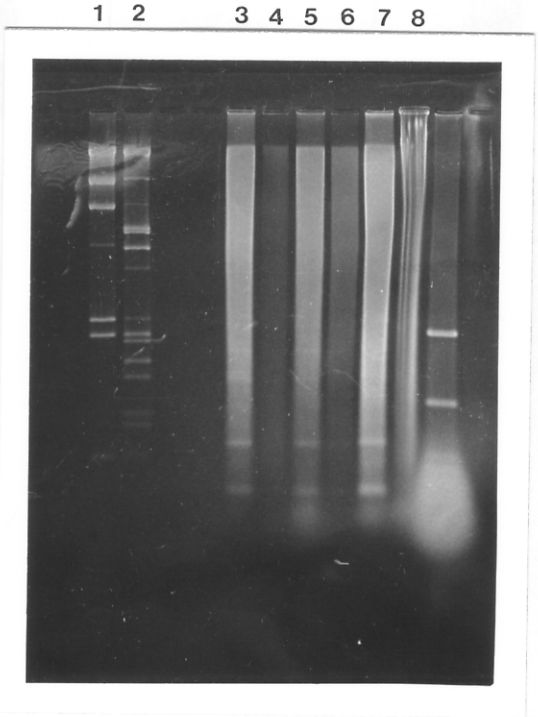


รูปที่ 2 แสดงผลการไฮบริไดซ์ระหว่าง λ-*Hin*dIII ที่มีความเข้มข้นต่างๆ และ λ-DNA ที่ติดฉลากด้วย biotin โดย λ-*Hin*dIII มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ Lane 1, 1 ไมโครกรัม; Lane 2, 0.5 ไมโครกรัม; Lane 3, 0.2 ไมโครกรัม; Lane 4, 0.1 ไมโครกรัม; Lane 5, 0.05 ไมโครกรัม

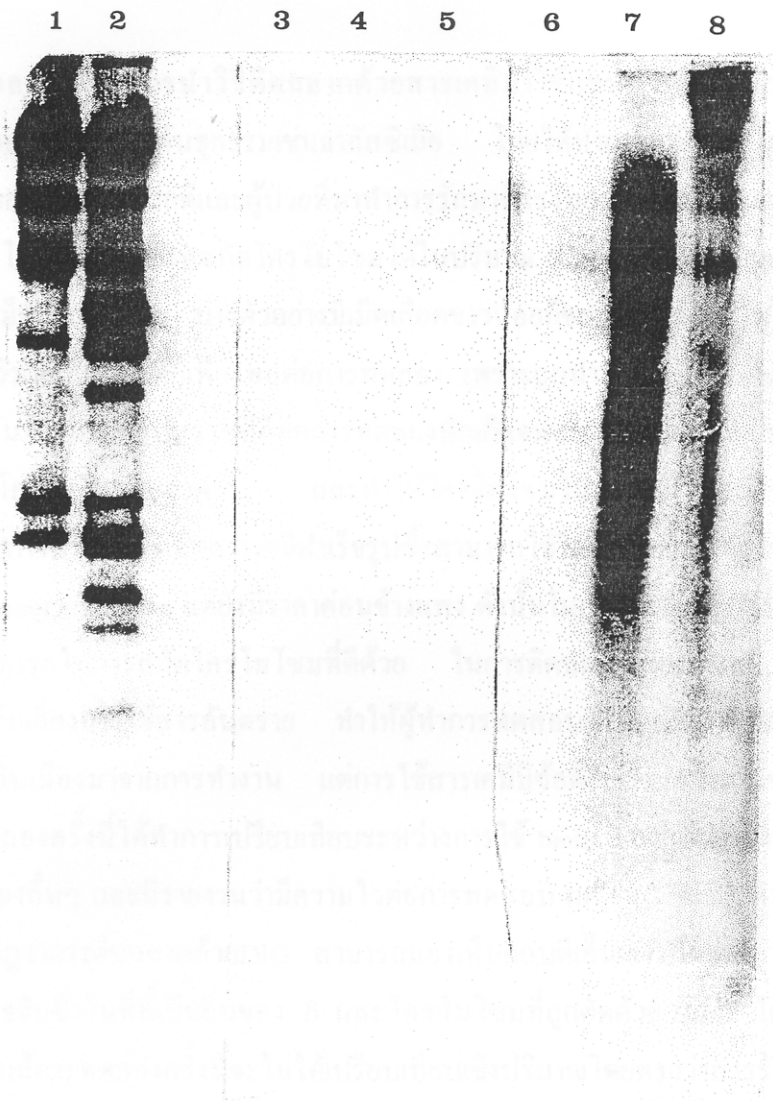
3. การใช้ดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วย Digoxigenin

Digoxigenin คือสารประเภทสเตียรอยด์มีขนาดเล็ก สกัดได้จากดอกไม้ชนิดหนึ่งชื่อ digitalis purpurea ซึ่งมีดอกสีม่วง ปัจจุบันบริษัท Boehhringer Mannheim ประเทศเยอรมนีนำมาผลิตเป็นการค้าโดยเชื่อมโมเลกุลของ digoxigenin เข้ากับกรดนิวคลีอิค dUTP สารนี้จะถูกนำไปใช้สังเคราะห์สายดีเอ็นเอด้วย Klenow enzyme ซึ่งทำให้ digoxigenin ติดกับดีเอ็นเอตรวจจับ ซึ่งจะสามารถตรวจสอบผลภายหลังการไฮบริไดเซชั่นได้ด้วยสารที่ทำให้เกิดสี การตรวจสอบโดยใช้ digoxigenin หรือเรียกย่อๆว่า DIG นี้ ทางบริษัทผู้ผลิตได้ระบุว่ามีความไวพอที่จะตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำถึง 1 พิโครกรัม ผู้วิจัยจึงได้นำมาใช้ในการทดลองซึ่งมีวิธีการทำเช่นเดียวกับข้อ 2 แต่เปลี่ยนการติดฉลากมาใช้ DIG แทน และเนื่องจากเป็นการทดลองที่ตรวจสอบว่าวิธีการจะใช้ได้ผลหรือไม่จึงยังไม่มีความจำเป็นที่ต้องทำกับเลือดผู้ป่วย การทดลองในครั้งนี้จึงเปลี่ยนมาใช้เลือดอาสาสมัครคนปกติแทน ผลการทดลองกับเลือดคนปกติแสดงในรูปที่ 3 โดย รูป 3 ก แสดงภาพจากแผ่น agarose gel ก่อนการ blot โดยใส่ตัวอย่าง Normal 1 ใน lane ที่ 1 และ 4; Normal 2 อยู่ใน lane ที่ 2 และ 5; และ Normal 3 อยู่ใน lane ที่ 3 และ 5 เมื่อทำการ blot ก็จะ

แยกแผ่นไนโตรเซลลูโลสออกเป็น 2 แผ่น แผ่นที่ 1 ได้แก่แผ่นที่ blot ดีเอ็นเอจาก lane 1-3 และแผ่นที่ 2 ได้แก่แผ่นที่ blot ดีเอ็นเอจาก lane 4-6 จะเห็นว่าไนโตรเซลลูโลสทั้งสองแผ่นต่างมีตัวอย่างชุดเดียวกัน แล้วจึงนำไปแยกไฮบริไดซ์โดยแผ่นที่ 1ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วย biotin ส่วนแผ่นที่ 2 ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วย DIG ผลการทดลองในรูปที่ 3 ข พบว่ามีแถบของดีเอ็นเอปรากฏให้เห็นบนแผ่นที่ 2 (บริเวณลูกศรชี้) ยกเว้นตัวอย่าง Normal 1 บน lane ที่ 4 ไม่พบแถบใดๆเลย ทั้งนี้อาจเนื่องจากการไฮบริไดซ์เกิดขึ้นบนแผ่นอย่างไม่สม่ำเสมอ ส่วนแผ่นที่ 1 นั้นไม่ปรากฏแถบใดๆขึ้นเลย จึงสรุปได้ว่าการตรวจสอบโดยติดฉลากด้วย DIG เท่านั้นที่มีความไวเพียงพอที่จะทำให้เกิดแถบบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยแถบนั้นเกิดจากการไฮบริไดซ์ระหว่างชิ้นส่วนของยีน δ ที่เป็นดีเอ็นเอตรวจจับ และยีนบนโครโมโซมของตัวอย่างที่สกัด



รูปที่ 3. ก. แสดงแบบแผนโครโมโซมบน 1% agarose gel ของตัวอย่าง Normal 1-3 ที่ถูกย่อยด้วย *Hin*fI โดยมี λ-*Hin*dIII และ λ-*Hin*dII-*Eco*RI เป็น marker (lane 1-2), ตัวอย่าง lane ที่ 3 และ6 คือตัวอย่าง Normal 1; lane ที่ 4 และ 7 คือ Normal 2 และ lane ที่ 5 และ 8 Normal 3



รูปที่ 3. ข. แสดงผลของแผ่นไนโตรเซลลูโลสภายหลังการ blot บนเจลในรูป ข ไฮบริไดซ์กับยีน δ ที่ติดฉลากด้วย Biotin (lane 3-5) และ DIG (lane 6-8) และมี λ-*Hin*dIII และ λ-*Hin*dII-*Eco*RI เป็น marker (lane 1-2),