

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการทดลอง จะแบ่งได้เป็น 3 ส่วนหลักคือ

1. การวิเคราะห์หา Primer ที่เหมาะสม โดยจะได้ทั้งหมด 2 ชุด ที่มีความจำเพาะกับ มนุษย์ และสุกร อีกทั้ง Primer ทั้ง 4 เส้นนี้ยังไม่เข้าจับกันเองอีกด้วยทดสอบโดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูป ของ Integrated DNA Technologies, Inc โดย Primer ที่ได้คือ

F 5'-TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT-3'

R 5'-ACTTGTCCAATGATGGTAAAAGG-3' สำหรับดีเอ็นเอของมนุษย์และ

F 5'-AATCTTGCAAATCCTAACCGGCC-3'

R 5'-CCGTTTGCATGTAGATAGCGAAT-3' สำหรับดีเอ็นเอของสุกร

2. ปริมาณและความเข้มข้นของสารที่จะนำมาใช้ผสมเป็น PCR mixture ขนาด 10 µl

Taq buffer	1 µl
dNTPs (1mM each)	1 µl
Taq polymerase (0.25/µl)	1 µl
Primer mix (3µM Primer มนุษย์)	1 µl
Primer mix (5µM Primer สุกร)	1 µl
DNA template (mix 1:1)	2 µl
Sterile water	3 µl

3. Condition ของพีซีอาร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับงานนี้คือ

Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ
จากนั้นจึงเข้าสู่รอบของ

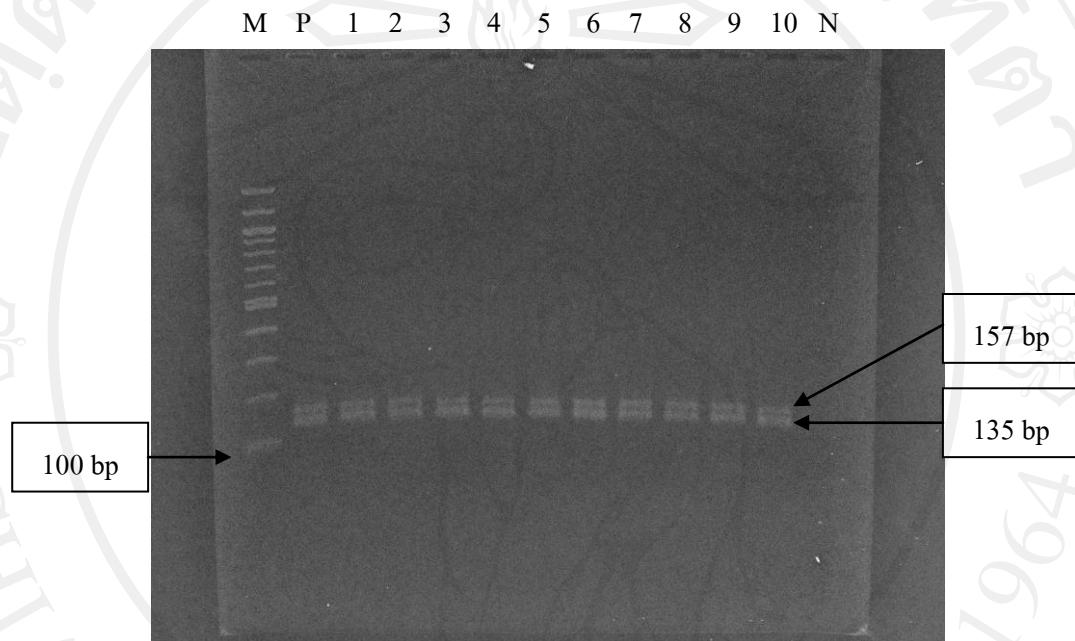
Denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 59°C เป็นเวลา 30 วินาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที

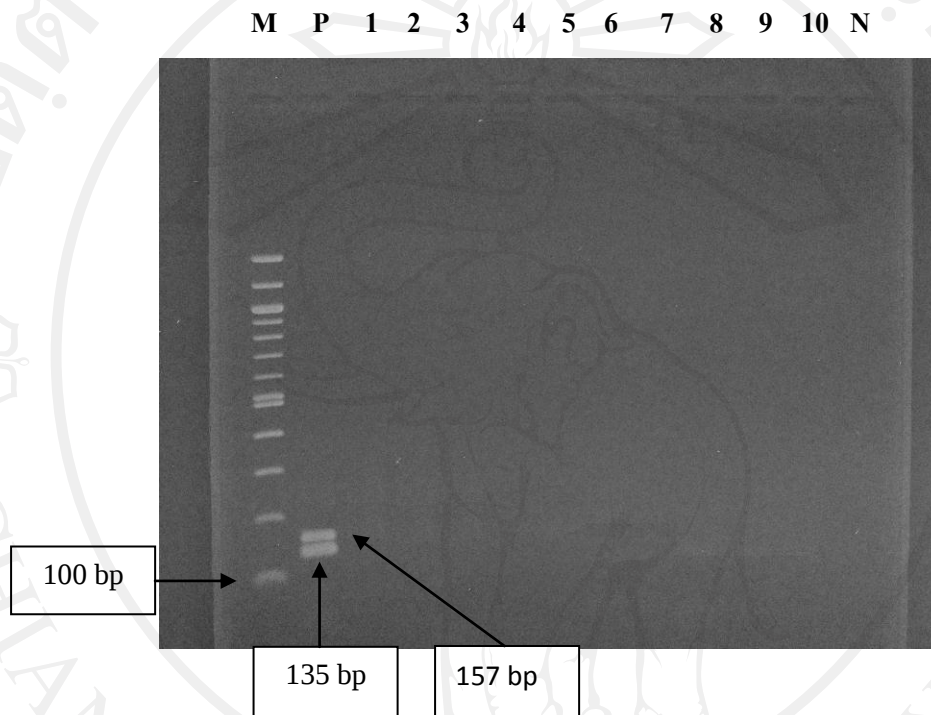
จำนวนทั้งสิ้น 32 รอบ

ผลการระบุสารพันธุกรรมผสมของมนุษย์และสุกร ด้วยการวิเคราะห์ชิ้นไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย โดยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำมาวิเคราะห์ใน Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 135 คู่เบสของสุกรและขนาดประมาณ 157 คู่เบสของมนุษย์ ทั้ง 45 ตัวอย่าง คิดเป็นความถูกต้อง 100 % และเมื่อทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้งต่อตัวอย่าง ยังได้ผลเหมือนเดิม (ภาพ 1)



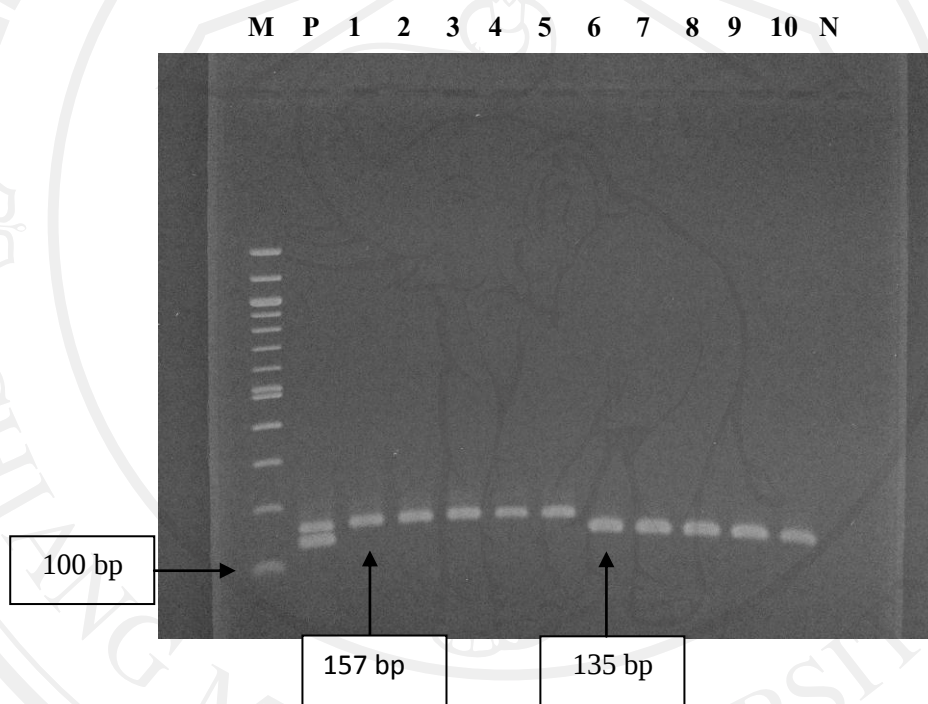
ภาพ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอบนตำแหน่ง 135 bp จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดสุกรและตำแหน่ง 157 bp จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ ด้วยการวิเคราะห์ชิ้นไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder); ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน, ช่อง P Positive control, ช่อง N Negative control (น้ำ), ช่องที่ 1-10 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสุกรและเลือดมนุษย์

เมื่อทำการทดสอบความจำเพาะของวิธีการที่ใช้ตรวจ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นได้ทั้งหมด 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 100% โดยตัวอย่างทั้งหมดได้ผ่าน กระบวนการตรวจสอบความถูกต้องในเบื้องต้นแล้วว่ามิติดีเอ็นเออยู่จริง โดยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม และจากการทดสอบซ้ำอีก 1 ครั้งก็ยังปรากฏผลเหมือนเดิมทุกประการ (ภาพ 2)



ภาพ 2 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอใน agarose gel ภายหลังจากทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดต่างๆ; ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder), ช่อง P Positive control, ช่องที่ 1-3 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อไก่, ช่องที่ 4-6 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อวัว, ช่องที่ 7-8 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อปลา, ช่องที่ 9-10 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากขนสุนัข, ช่อง N Negative control (น้ำ)

และเนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ใช้ Primer ด้วยกัน 2 ชุดที่ผสมกันจึงได้มีการทดสอบดูว่า จะมีการจับของ Primer ที่ไม่ถูกคู่หรือไม่เช่น Primer ของมนุษย์ เส้นใดเส้นหนึ่งไปจับกับ DNA template ของสุกรซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกเท็จได้ จึงได้ใช้ PCR mixture ชุดนี้มาใส่ DNA template ของสัตว์ชนิดเดียว คือมนุษย์ หรือสุกร โดยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำมาวิเคราะห์ใน Agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) พบว่าในแต่ละตัวอย่าง นั้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวซึ่งเป็นของชนิดนั้นๆ ทั้งอย่างละ 45 ตัวอย่าง



ภาพ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอบนตำแหน่ง 157 bp ของตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ และตำแหน่ง 135 bp ของตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดสุกร; ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน, ช่อง P Positive control, ช่อง N Negative control (น้ำ), ช่องที่ 1-5 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์, ช่องที่ 6-10 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสุกร

ผลการระบุดีเอ็นเอของมนุษย์และสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย
ทั้งหมดจำนวน 45 ตัวอย่าง และแต่ละตัวอย่างได้ทำการทดสอบซ้ำ ได้แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอมนุษย์และสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

ตัวอย่างที่	ผลการตรวจ	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+

ตาราง 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ผลการตรวจ	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
23	+	+
24	+	+
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	+
30	+	+
31	+	+
32	+	+
33	+	+
34	+	+
35	+	+
36	+	+
37	+	+
38	+	+
39	+	+
40	+	+
41	+	+
42	+	+
43	+	+
44	+	+
45	+	+

หมายเหตุ

+ คือ สามารถตรวจพบแถบสีเอ็นเอทีขนาดประมาณ 135 และ 157 คู่เบส
ตัวอย่างที่ 1 – 45 = คีเอ็นเอทีสกัดจากเลือดมนุษย์และเลือดสุกรที่ผสมกันแล้ว

หลังจากทำการทดสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมผสมของมนุษย์และสุกรทั้งหมดแล้ว จึงได้ทำการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการและ Primer ที่ใช้กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของ สัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ เนื้อปลา เนื้อไก่ เนื้อวัว และขนสุนัข อย่างละ 12 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 48 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างได้ทำการสกัดด้วยวิธี Chelex และทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์และวิธีการเดียวกันกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมผสมของมนุษย์และสุกร ผลคือ ไม่ปรากฏผลบวกใดๆ นอกจากตัวอย่างที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวกซึ่งเป็นตัวอย่างจากเลือดของมนุษย์ และสุกรเท่านั้น

ตาราง 2 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอกับตัวอย่างดีเอ็นเอของ ไก่ วัว สุนัข และปลา

ตัวอย่างที่	ผล	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	—	—
2	—	—
3	—	—
4	—	—
5	—	—
6	—	—
7	—	—
8	—	—
9	—	—
10	—	—
11	—	—
12	—	—
13	—	—

ตาราง 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ผล	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
14	—	—
15	—	—
16	—	—
17	—	—
18	—	—
19	—	—
20	—	—
21	—	—
22	—	—
23	—	—
24	—	—
25	—	—
26	—	—
27	—	—
28	—	—
29	—	—
30	—	—
31	—	—
32	—	—
33	—	—
34	—	—

ตาราง 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ผล	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
35	—	—
36	—	—
37	—	—
38	—	—
39	—	—
40	—	—
41	—	—
42	—	—
43	—	—
44	—	—
45	—	—
46	—	—
47	—	—
48	—	—

หมายเหตุ

— คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 135 หรือ 157 คู่เบส

ตัวอย่างที่ 1 – 12 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อไก่

ตัวอย่างที่ 13 – 24 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อปลา

ตัวอย่างที่ 25 – 36 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อวัว

ตัวอย่างที่ 37 – 48 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากขนสุนัข

เมื่อนำผลการทดลองจากตาราง 1 และ ตาราง 2 มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้ในการระบุดีเอ็นเอของมนุษย์และสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีและจากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ Primer ที่ใช้ในการตรวจระบุดีเอ็นเอ สามารถสร้างเป็นตาราง 2 x 2 แสดงความจำเพาะของ Primer ได้ดังตาราง 3 จะเห็นว่า การระบุตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์จำนวน 45 ตัวอย่าง ให้ผลถูกต้องหรือให้ผลบวกทั้งหมด 45 ตัวอย่าง และดีเอ็นเอของสุกรจำนวน 45 ตัวอย่าง ก็ให้ผลบวกทั้งหมด 45 ตัวอย่าง และเมื่อตรวจความจำเพาะของวิธีการด้วยการตรวจกับตัวอย่างที่เป็นสัตว์อื่นอีกจำนวน 48 ตัวอย่าง ก็ให้ผลเป็นลบทั้งหมด 48 ตัวอย่าง

ตาราง 3 แสดงความจำเพาะของวิธีการที่ใช้ในการระบุดีเอ็นเอของมนุษย์และสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

ผลตรวจ	มนุษย์และ สุกร	สัตว์อื่น	รวม
ผลบวก	45	0	45
ผลลบ	0	48	48
รวม	45	48	93

จากผลการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าว เมื่อนำมาคำนวณค่าความถูกต้อง และความจำเพาะเจาะจงของการทดสอบพบว่าได้เท่ากับ 100 % ทั้งสองค่า