การทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานเครื่อง *ThermoBlock* * เปรียบเทียบกับ Waterbath

ลลนา นันทการณ์ [1] ศิริวุฒิ ปุริโส [1]

1 บริษัท เมดิคอลอินสทรูเมนท์เทคโนโลยี จำกัด (บริษัท เอ็ม ไอ ที แอดวานซ์ จำกัด)

โทรศัพท์ : 0-2943-8480 โทรสาร : 0-2907-0037 e-mail : mitthailand@gmail.com

* เครื่องอุ่นสารละลายแบบแห้งด้วยบล๊อคอลูมิเนียม พัฒนาขึ้นโดยบริษัท เมดิคอลอินสทรูเมนท์เทคโนโลยี จำกัด โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนาเครื่องต้นแบบจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

- ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการวิจัย 1 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ผู้ควบคุมแลการทดลอง รศ.ดร.สุพรรณ ฟู่เจริญ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานของ ***ThermoBlock*** ซึ่งเป็นเครื่องมือประดิษฐ์ เปรียบเทียบกับ Waterbath ที่เป็นเครื่องมือที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ โดยได้เลือกวิธีการทดสอบฮีโมโกลบินอี โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจกรองฮีโมโกลบินอี **KKU DCIP - Clear** เพื่อทดสอบในบล๊อคสำหรับหลอดทดลองขนาด 12x75 มม. และการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์เพียงชนิดเดียว เพื่อทดสอบในบล๊อคสำหรับหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. เนื่องจากทั้งสองวิธีการนี้ อุณหภูมิมีผลต่อความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาในการทดลองอย่างมาก จึงได้เลือกเป็นวิธีการทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องมือประดิษฐ์ นอกจากการทดสอบเชิงวิทยาศาสตร์แล้วนั้น ยังได้ทดสอบเชิงกายภาพวัดอุณหภูมิโดยตรงจากทุกหลุม เพื่อทดสอบความเท่ากันของอุณหภูมิ (Temperature Uniformity)ในทุกหลุมของเครื่อง ***ThermoBlock*** ดังกล่าวอีกด้วย

การทดสอบฮีโมโกลบินอี โดยการตกตะกอนด้วยสีดีซีไอพี (Dichlorophenol indophenol (DCIP) precipitation test) ด้วยชุดน้ำยาตรวจกรองฮีโมโกลบินอี KKU DCIP – Clear

หลักการ ฮีโมโกลบินอี เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติ (Hb variant) ที่เกิดจากกรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 26 ในสายเบตาโกลบิน เปลี่ยนจากกรดกลูตามิค (Glu) ไปเป็น ไลซีน (Lys) ซึ่งไปมีผลทำให้พันธะที่ยึดระหว่างสายอัลฟาโกลบินกับเบตาโกลบิน เหนี่ยวแน่นน้อยลง ฮีโมโกลบินที่ควรจะอยู่ในรูปของเตตระเมอร์ (tetramer) จึงหลุดออกจากกันอยู่ในรูปของโมโนเมอร์ (monomer) ในสารละลายดีซีไอพี ทำให้เกิดมีหมู่ซัลฟ์ไฮดริล อิสระ (- SH) ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์โดย สีดีซีไอพี ทำให้สายโกลบินที่อยู่ในรูปโมโนเมอร์ ตกตะกอนลงมา

วิธีการ

1. นำเลือด ที่มีอีดีทีเอ (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็งมาปั่นที่ 1000 g นาน 10 นาที แล้วแยก เอาส่วนที่เป็นพลาสมาทิ้งไป
2. นำเม็ดเลือดแดงจากข้อ 1 0.02 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี DCIP Reagent 2 มล. ผสมเลือดกับน้ำยา ปิดฝาทดลองด้วยพาราฟิล์ม
3. นำไปอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37.5 °C 15 นาที
4. เมื่อครบเวลาแล้วเติม Clearance Reagent 0.02 มล. ผสมเลือดกับน้ำยา เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านผลจากความขุ่นของสารละลายด้วยสายตา

การแปลผล

ผลลบ (Negative) : สารละลายใสไม่มีตะกอนสีน้ำตาล

ผลบวก (Positive) : สารละลายขุ่นมีตะกอนสีน้ำตาล

แผนการทดลอง

1. สุ่มเลือดตัวอย่างจำนวน 50 ราย จากบุคคลทั่วไปที่สนใจรับการตรวจหาฮีโมโกลบินอี ด้วยวิธีการตกตะกอนสี ดีซีไอพี โดยเลือดตัวอย่างแต่ละรายจะได้รับการทดสอบใน ***ThermoBlock*** และ Waterbath เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง

ผลการทดลอง

1. ตารางแสดงผลการทดลองตรวจ ฮีโมโกลบินอี โดยชุดน้ำยาตรวจกรองฮีโมโกลบินอี KKU DCIP - Clear จำนวน 50 ราย

		Result of Waterbath	
		Positive	**Negative**
Result of *ThermoBlock*	**Positive**	**16**	**0**
	Negative	**0**	**34**

N = 50

Sensitivity = 16/16 = 100 %

Specificity = 34/34 = 100%

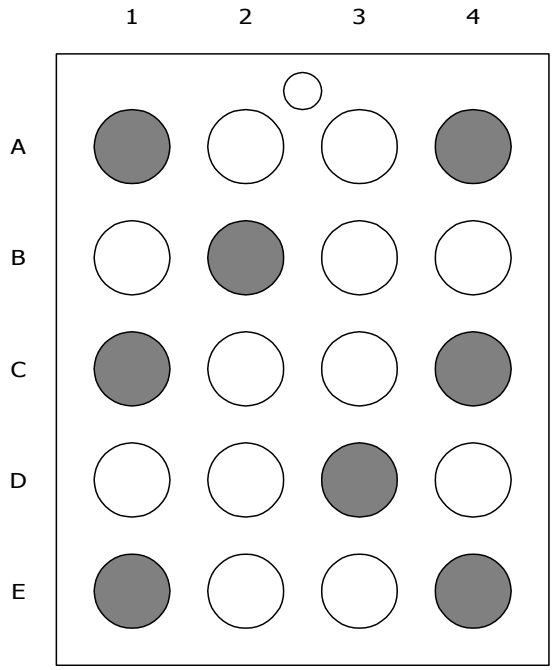
Positive Predictive Value = 16/16 = 100 %

Negative Predictive Value = 34/34 = 100%

จากการทดลอง แสดงค่าความถูกต้อง (Sensitivity) 100% และ ความจำเพาะ (Specificity) 100 % ของการทดสอบเปรียบเทียบผลระหว่าง ***ThermoBlock*** กับ Waterbath ดังนั้น ***ThermoBlock*** สามารถใช้งานทดแทน Waterbath ในการทดสอบปฏิกิริยานี้ได้อย่างสมบูรณ์

แผนการทดลอง

2. ทดสอบความเท่ากันของหลุมอุณหภูมิ (Temperature Uniformity)ภายใน ***ThermoBlock*** โดยวัดค่าความขุ่นของการตรวจหาฮีโมโกลบินอี ด้วยวิธีการตกตะกอนสี ดีซีไอพี ซึ่งใช้ Spectrometer ช่วงความยาวคลื่นที่ 800 นาโนเมตรโดยสุ่มตัวอย่าง 8 หลุมทดสอบจากทั้งหมด 20 หลุมทดสอบ ซึ่งตำแหน่งทั้ง 8 หลุมทดสอบเปรียบเสมือน ทุกหลุมที่ใกล้เคียงได้ทดสอบด้วย ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. แสดงตำแหน่งหลุมที่ถูกทดสอบ ในบล๊อคสำหรับหลอดทดลองขนาด 12x75 มม.

ได้นำตัวอย่างเลือด 4 ราย โดยแต่ละรายตรวจหาฮีโมโกลบินอี ด้วยวิธีตกตะกอนสี ดีซีไอพี ในคราวเดียวกัน 8 หลุมทดสอบซึ่งผลการตรวจกรองฮีโมโกลบินอีมีผลเป็นลบทั้งหมด แล้วนำมาวัดความขุ่นโดยใช้เครื่อง Spectrometer

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงผลการวัดความขุ่นจากหลุมทดสอบ 8 ตำแหน่ง ในจำนวนตัวอย่าง 4 ราย

ตำแหน่งหลุม	Case Number	ค่า OD	ตำแหน่งหลุม	Case Number	ค่า OD
A1	1	.061	A1	3	.104
A3	1	.068	A3	3	.099
A5	1	.086	A5	3	.086
B2	1	.083	B2	3	.075
C4	1	.085	C4	3	.093
D1	1	.082	D1	3	.091
D3	1	.105	D3	3	.084
D5	1	.078	D5	3	.098
A1	2	.082	A1	4	.071
A3	2	.102	A3	4	.075
A5	2	.085	A5	4	.096
B2	2	.070	B2	4	.090
C4	2	.128	C4	4	.091
D1	2	.101	D1	4	.082
D3	2	.099	D3	4	.102
D5	2	.104	D5	4	.094

2. จากผลข้อมูลดิบของตารางที่ 1 นำมาวิเคราะห์ เชิงสถิติด้วยวิธี Two-way ANOVA (RCBD) โดยโปรแกรม SPSS เพื่อทดสอบความแตกต่างของตำแหน่งหลุมทดสอบในเครื่อง ***ThermoBlock*** ซึ่งเป็นปัจจัยเป้าหมาย โดยแบ่งออกเป็น 8 ตำแหน่งหลุมทดสอบ พบว่า มี p – value = 0.240 ซึ่งมากกว่า 0.05 ดังนั้น ยอมรับ Ho นั่นคือ หลุมทดสอบทั้ง 8 หลุม มีประสิทธิภาพให้ผลค่าวัดความขุ่นไม่แตกต่างกัน

การตัดดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ (Cutting of DNA with Restriction Enzymes)

หลักการ เรสตริกชันเอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นเอนไซม์ที่จดจำ Sequence ที่เฉพาะเจาะจงที่เรียกว่า Recognition sequence ของดีเอ็นเอสายคู่ และสามารถตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ในสายดีเอ็นเอขาดออกจากกัน

วิธีการ

1. เตรียม PCR product สำหรับใช้ในการตัด โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเบตาโกลบินยีน ซึ่งได้ขนาด 1 kb
2. ใช้เอนไซม์ EcoRI ตัด PCR product ของเบตาโกลบินยีน ที่อุณหภูมิที่ 37.5 °C นาน 2 ชม.
3. โดยนำไปไว้ที่ Waterbath 2 หลอดทดลอง และที่ ***ThermoBlock*** 9 หลอด ตามตำแหน่งต่างๆ ดังรูปที่ 2 นอกจากนี้ยังมีหลอด Negative control ใน Waterbath และ ***ThermoBlock*** อย่างละ 1 หลอด

การแปลผล

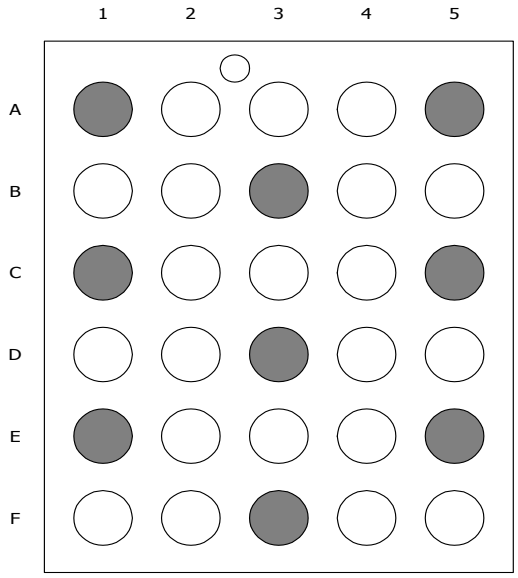
นำเบตาโกลบินยีนที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI run 1.5% Agarose gel แล้วย้อมด้วย Ethidiumbromine ดูผลด้วยแสง UV

ผลลบ (Negative) : เห็นขนาดของ PCR product เป็น 1 kb

ผลบวก (Positive) : เห็นขนาดของ PCR product เป็น สองขนาดคือ ขนาด 308 bp และ 782 bp

แผนการทดลอง

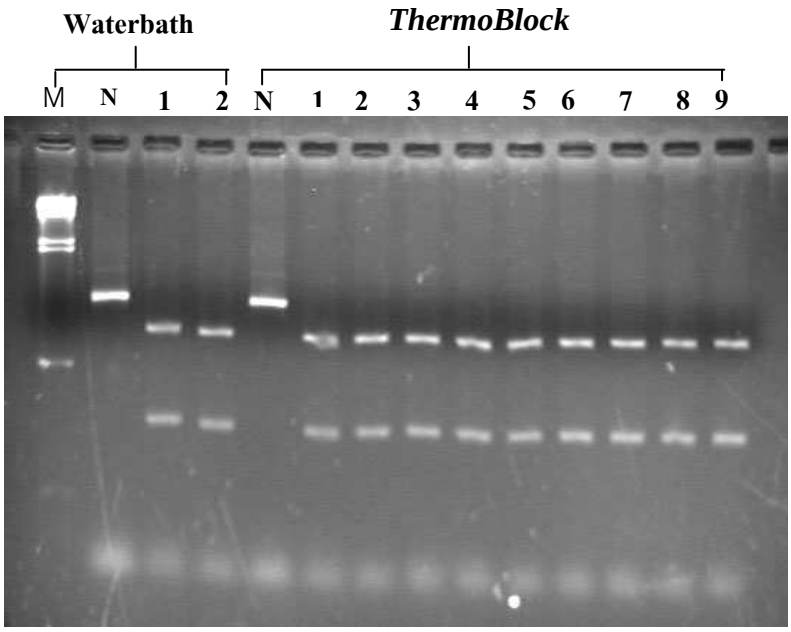
1. ทดสอบเปรียบเทียบการตัดดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ระหว่าง เครื่อง ***ThermoBlock*** และ Water bath
2. ทดสอบเปรียบเทียบผลการตัดดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ ภายในหลุมทดสอบของบล๊อคสำหรับหลอดทดลอง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ของเครื่อง ***ThermoBlock***



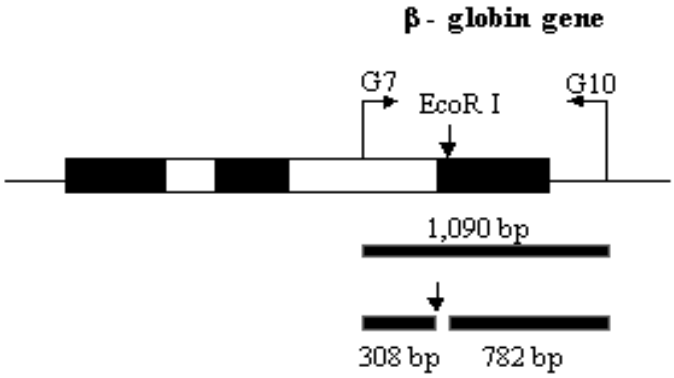
รูปที่ 2. แสดงตำแหน่งหลุมของ block microcentrifuge tube ที่ถูกทดสอบการตัดเอนไซม์จำเพาะ

ผลการทดลอง

ผลการตัดดีเอ็นเอเบตาโกลบินยีน ด้วยเอนไซม์ EcoRI ดังรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเครื่อง ***ThermoBlock*** มีประสิทธิภาพให้ผลบวกเทียบเท่ากับ Waterbath และตำแหน่งทั้ง 9 หลุมทดสอบภายในเครื่อง ***ThermoBlock*** ก็ให้ผลบวกไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลการตัดดีเอ็นเอของเบตาโกลบินยีน ด้วยเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI
M = Marker DNA 1 kb ladder , N = Negative Control , Lane 1 และ 2 = positive results of waterbath , Lane 1 – 9 = positive results of *ThermoBlock* ซึ่งตำแหน่งของหลุมคือ 1 = A1 ,2 = C1, 3 = E1, 4 = B3 , 5 = D3 ,6 = F3 , 7 = A5 ,8 = C5 , 9 = E5 ตามลำดับ



รูปที่ 4 แสดง ตำแหน่งการตัดของเรสตริกชันเอนไซม์ EcoRI บนดีเอ็นเอของเบตาโกลบินยีน

การทดสอบความเท่ากันของอุณหภูมิ (Temperature Uniformity) ของหลุมในเครื่อง *ThermoBlock*

เพื่อเป็นการทดสอบความเท่ากันของอุณหภูมิในทุกหลุมทดสอบของเครื่อง ***ThermoBlock*** โดยการวัดอุณหภูมิจากหลุมทดสอบทั้งหมด ซึ่งใช้ดิจิตอลเทอร์โมมิเตอร์เป็นเครื่องมือวัดอุณหภูมิโดยตรง

วิธีการ

1. เปิดเครื่อง ***ThermoBlock*** ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที เพื่ออุ่นเครื่อง
2. ใส่น้ำกลั่นลงไปในหลุม หลุมละ 1 มล. แล้วทิ้งไว้ 5 นาทีจึงเริ่มวัดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องดิจิตอลเทอร์โมมิเตอร์ ในการวัดแต่ละครั้งใช้เวลาห่างกันหลุมละ 10 วินาที
3. ทำการวัดซ้ำ หลุมละ 5 ครั้ง ทุกหลุมทดสอบโดยในบล๊อคสำหรับหลอดทดลองขนาด 12x75 มม. มี 20 หลุม และบล๊อคสำหรับหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. มี 30 หลุม

ผลการทดลอง

1. บล๊อคสำหรับหลอดทดลองขนาด 12 x 75 มม.

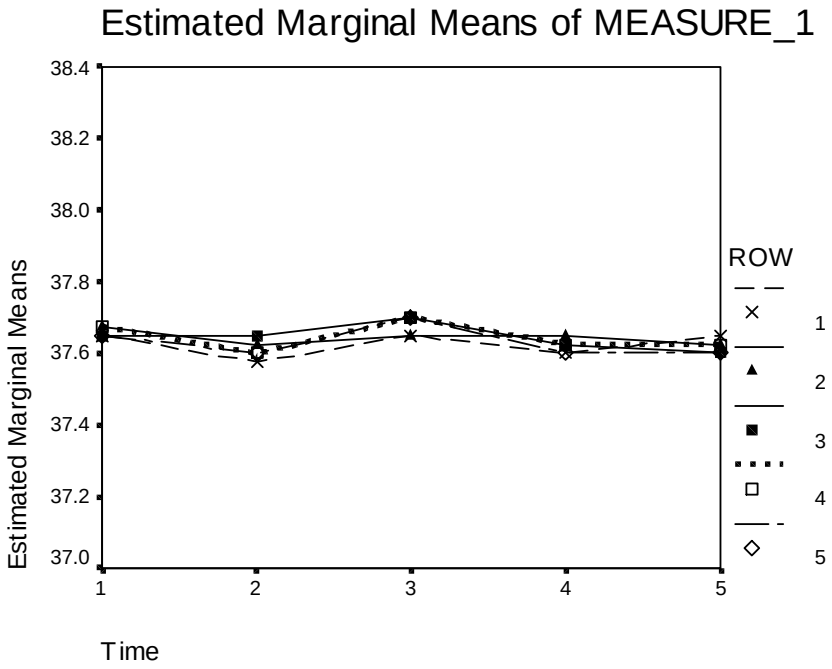
ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติ โดยวิธี Repeated Measurement ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่า เมื่อเปรียบเทียบตามแถวของหลุมทดสอบมี p – value = 0.908 ซึ่งมากกว่า 0.05 ดังนั้นยอมรับ Ho นั่นคือ แสดงผลการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มแนวแถว ซึ่งข้อมูลนี้พบว่าอุณหภูมิของหลุมทดสอบตามแนวแถวไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังรูปที่ 5

เมื่อเปรียบเทียบตามแนวสดมภ์ของหลุมทดสอบมี p – value = 0.067 ซึ่งมากกว่า 0.05 จึงยอมรับ Ho นั่นคือ แสดงผลการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มแนวสดมภ์ ซึ่งข้อมูลนี้พบว่าอุณหภูมิของหลุมทดสอบตามแนวสดมภ์ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังรูปที่ 6

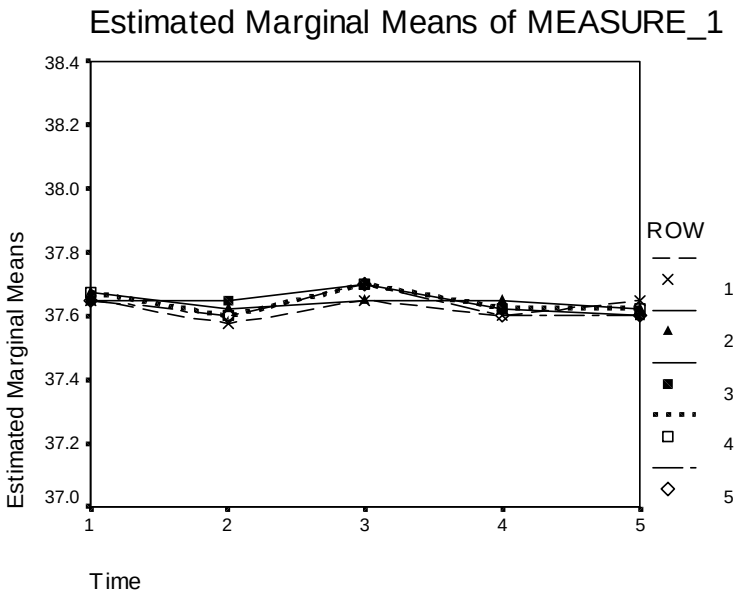
2. บล๊อคสำหรับ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล.

ผลการวิเคราะห์เชิงสถิติ โดยวิธี Repeated Measurement ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่า เมื่อเปรียบ เทียบตามแถวของหลุมทดสอบมี p – value = 0.984 ซึ่งมากกว่า 0.05 ดังนั้นยอมรับ Ho นั่นคือ แสดงผล การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มแนวแถว ซึ่งข้อมูลนี้พบว่าอุณหภูมิของหลุมทดสอบตามแนว แถวไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังรูปที่ 7

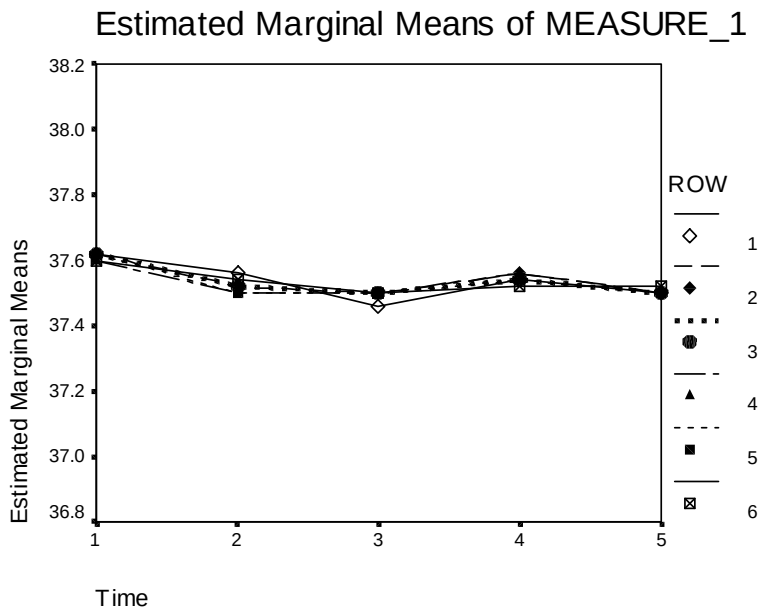
เมื่อเปรียบเทียบตามแนวสดมภ์ของหลุมทดสอบมี p – value =0.00 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธ Ho นั่นคือ แสดงผลการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มแนวสดมภ์ ซึ่งข้อมูลนี้พบอุณหภูมิของหลุมทดสอบตามแนวสดมภ์มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่เมื่อพิจารณาจากอุณหภูมิที่ต่างกัน นั่นเพียง 0.1 °C ซึ่งในทางปฏิบัติงานจริงแล้วไม่มีผลต่อการทดลอง ดังรูปที่ 8



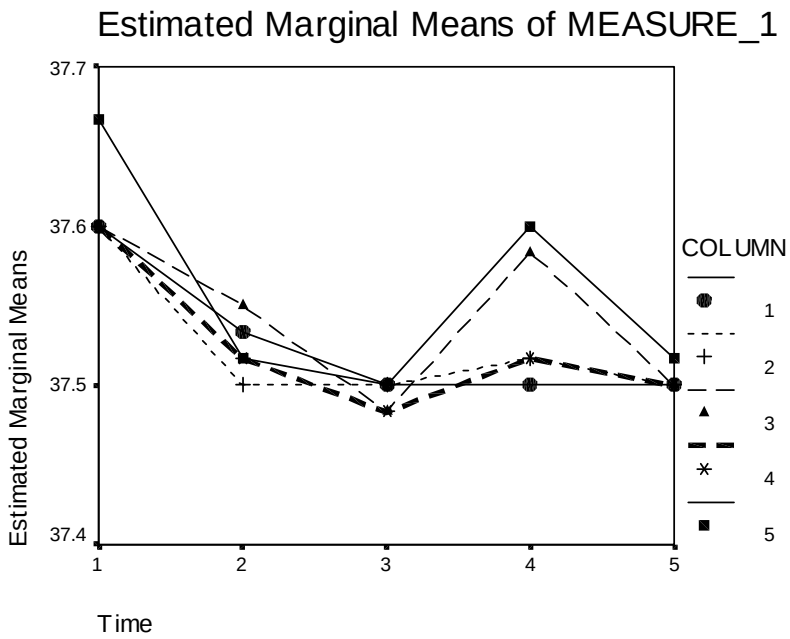
รูปที่ 5 แสดงกราฟของค่าเฉลี่ยคะแนนที่วัดซ้ำในแต่ละครั้ง ทำให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงโดยเฉลี่ยตามการวัดซ้ำ ตามแนวแถวของบล๊อคขนาด 12x75 มม. ซึ่งอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 6 แสดงกราฟของค่าเฉลี่ยคะแนนที่วัดซ้ำในแต่ละครั้ง ทำให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงโดยเฉลี่ยตามการวัดซ้ำ ตามแนวสดมภ์ของบล๊อคขนาด 12x75 มม. ซึ่งอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 7 แสดงกราฟของค่าเฉลี่ยคะแนนที่วัดซ้ำในแต่ละครั้ง ทำให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงโดยเฉลี่ยตามการวัดซ้ำ ตามแนวแถวของบล๊อค Microcentrifuge tube ซึ่งอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 8 แสดงกราฟของค่าเฉลี่ยคะแนนที่วัดซ้ำในแต่ละครั้ง ทำให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงโดย เฉลี่ยตามการวัดซ้ำ ตามแนวสดมภ์ ของบล๊อค Microcentrifuge tube ซึ่งอุณหภูมิมีความแตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาจากอุณหภูมิที่ต่างกันเพียง 0.1 °C ซึ่งในทางปฏิบัติงานจริงแล้วไม่มีผลต่อการทดลอง