บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) จากตัวอย่างฟันที่ถูกเผา

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในตัวอย่างฟันโดยใช้เทคนิคแลมป์พบว่าอุณหภูมิการแช่อบ ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y คือ แช่อบที่ 63 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และความเข้มข้นของสารเคมีในสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ปรากฏดังตารางที่ 2

ตาราง 2 ความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาของเทคนิคแลมป์ ต่อ ปฏิกิริยา

Chemical	**Concentrate / tube (25 µl)**
H_20	-
10X Buffer	1X
Betaine	0.8 M
dNTPs	0.4 mM each
Primer Mixs	FIP&BIP 1.6 µM each F3&B3 0.2 µM each
Bst DNA polymerase	0.32 U/ µl
Template	-

การศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ผู้ศึกษาได้ใช้ตัวอย่างสารพันธุกรรมที่สกัดจากฟันด้วยวิธี Phenol chloroform extraction มาทำการเพิ่มปริมาณตรงส่วนของยีน Amelogenin Y จากกลุ่มตัวอย่าง 20 คน แบ่งเป็นชาย 10 คน หญิง 10 คน แบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัวอย่าง มีทั้งสองเพศจำนวนเท่าๆกัน เพศละ 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างกลุ่มที่หนึ่ง ถูกนำไปเผาด้วยเตาถ่าน ส่วนอีกกลุ่มถูกเผาด้วยเตาแก๊ส ตัวอย่างถูกนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP แล้วตรวจวิเคราะห์ LAMP product ด้วยอะคริลามายด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4 และลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคแลมป์ที่ได้ทำการตรวจสอบด้วยอะคริลามายด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้แสดงไว้ดังภาพ 10 และ 11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 10 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) จากตัวอย่างฟันที่ถูกเผาด้วยเตาถ่าน

ช่องที่ 1 คือ 100 bp ladder

ช่องที่ 2 คือ ตัวควบคุมผลบวก (ตัวอย่างเลือด)

ช่องที่ 3 คือ ตัวควบคุมผลบวก (ตัวอย่างฟัน)

ช่องที่ 4 คือ ตัวควบคุมผลลบ (H_2O)

ช่องที่ 5-9 คือ ตัวอย่างฟันเพศชายที่ให้ผลบวก (Smear pattern)

ช่องที่ 10 คือ ตัวควบคุมผลลบ (ฟันเพศหญิงที่ถูกเผาด้วยเตาถ่าน)

ช่องที่ 11-14 คือ ตัวอย่างฟันเพศหญิงที่ให้ผลลบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) จากตัวอย่างฟันที่ถูกเผาด้วยเตาถ่าน

Sample NO.	Test	Sample Code	Sample Sex
1	P	M -01	M
2	P	M -02	M
3	P	M -03	M
4	P	M -04	M
5	P	M -05	M
6	N	F -01	F
7	N	F -02	F
8	N	F -03	F
9	N	F -04	F
10	N	F -05	F

หมายเหตุ

P คือ Positive หมายถึง ตรวจพบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

N คือ Negative หมายถึง ตรวจไม่พบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

M คือ Male (เพศชาย)

F คือ Female (เพศหญิง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 11 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) จากตัวอย่างฟันที่ถูกเผาด้วยเตาแก๊ส

ช่องที่ 1 คือ 100 bp ladder

ช่องที่ 2 คือ ตัวควบคุมผลบวก (ตัวอย่างเลือด)

ช่องที่ 3 คือ ตัวควบคุมผลบวก (ตัวอย่างฟัน)

ช่องที่ 4 คือ ตัวควบคุมผลลบ (H_2O)

ช่องที่ 5 และ 8 คือ ตัวอย่างฟันเพศชายที่ให้ผลลบ

ช่องที่ 6 และ7 คือ ตัวอย่างฟันเพศชายที่ให้ผลบวกโดยพบแถบ DNA ปรากฏให้เห็น (Arrow)

ช่องที่ 9 คือ ตัวอย่างฟันเพศชายที่ให้ผลบวก (Smear pattern)

ช่องที่ 10 คือ ตัวควบคุมผลลบ (ฟันเพศหญิงที่ถูกเผาด้วยเตาแก๊ส)

ช่องที่ 11 คือ ตัวอย่างฟันเพศหญิงที่ให้ผลลบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification จากตัวอย่างฟันที่ถูกเผาด้วยเตาแก๊ส

Sample NO.	Test	Sample Code	Sample Sex
11	N	M -06	M
12	P	M -07	M
13	P	M -08	M
14	N	M -09	M
15	P	M -10	M
16	N	F -06	F
17	N	F -07	F
18	N	F -08	F
19	N	F -09	F
20	N	F -10	F

หมายเหตุ

P คือ Positive หมายถึง ตรวจพบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

N คือ Negative หมายถึง ตรวจไม่พบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

M คือ Male (เพศชาย)

F คือ Female (เพศหญิง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 เปรียบเทียบผลการระบุเพศในตัวอย่างฟันที่ถูกเผาด้วยเทคนิคแลมป์

Sex determination result	Sample Sex		Total
	Male	Female	
Positive	8	0	8
Negative	2	10	12
Total	10	10	20

จาก ตาราง 5 เปรียบเทียบผลการทดสอบการระบุเพศในตัวอย่างฟันที่ถูกเผาจำนวนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคแลมป์แสดงให้เห็นว่า ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เป็นเพศชายทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 8 ตัวอย่าง เป็นแบบ Smear และให้ผลลบ 2 ตัวอย่าง สำหรับผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงจำนวน 10 ตัวอย่าง ให้ผลลบทั้ง 10 ตัวอย่าง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์สามารถคำนวณค่า Performance Characteristics และ ทดสอบสมมติฐานด้วยไคสแควร์ (Chi-Square) ได้ดังนี้

ค่า Performance Characteristics

Sensitivity (ความไวของการทดสอบ)

คือ โอกาสที่การทดสอบ Amelogenin Y gene ในเพศชาย จะได้ผลบวก (Positive)

= 8 ÷ 10 = 0.8 = 80 %

Specificity (ความจำเพาะของการทดสอบ)

คือ โอกาสที่การทดสอบ Amelogenin Y gene ในเพศหญิง จะได้ผลลบ (Negative)

= 10 ÷ 10 = 1 = 100%

False Negative Rate (อัตราผลลบเท็จ)

คือ โอกาสที่การทดสอบ Amelogenin Y gene ในเพศชาย จะได้ผลลบ (Negative)

= 2 ÷10 = 0.2 = 20%

False Positive Rate (อัตราผลบวกเท็จ)

คือ โอกาสที่การทดสอบ Amelogenin Y gene ในเพศหญิง จะได้ผลบวก (Positive)

= 0÷10 = 0 = 0%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Predictive Value Positive

คือ โอกาสที่ผู้ได้ผลตรวจบวก (Positive) จะเป็นเพศชาย

= 8÷8 = 1 = 100%

Predictive Value Negative

คือ โอกาสที่ผู้ได้ผลตรวจลบ (Negative) จะไม่ใช่เพศชาย

= 10 ÷ 12 = 0.83 = 83%

ทดสอบสมมติฐานด้วยไคสแควร์

จากสมมติฐาน

H_0 = เทคนิคแลมป์สามารถตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ผลไม่แตกต่างกัน

H_1 = เทคนิคแลมป์สามารถตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ผลแตกต่างกัน

เขียนเป็นสมมติฐานทางสถิติได้ดังนี้

$H_0: \mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

กำหนดค่า $\propto$ = 0.01

df = (r-1)(c-1) โดยที่ r = จำนวนแถวในตาราง และ c = จำนวนคอลัมน์ในตาราง

df = (2-1)(2-1) = 1

ค่าไคสแควร์จากตาราง (ดูในภาคผนวก ฉ) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01, df = 1 = 6.635

หาค่าตัวแปรสำหรับการทดสอบไคสแควร์แสดงไว้ในตาราง 6

ตาราง 6 ตารางค่าตัวแปรคำนวณ Chi-square

O	$E = \frac{R \times C}{N}$	$(O-E)^2$	$X^2 = \sum \frac{O-E^2}{E}$
8	4	16	4
0	4	16	4
2	6	16	2.67
10	6	16	2.67
-	-	-	13.34

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อ R = ผลค่าความถี่ในแถว O = ค่า Observation ได้จากตาราง

C = ผลค่าความถี่ในคอลัมน์ E = ค่า Expectation ได้จากการคำนวณ

N= ผลรวมค่าความถี่ทั้งหมด

คำนวณค่า χ^2 จากสูตร $\chi^2 = \sum_{i}^{r} = 1 \sum_{j}^{c} = 1 \quad \frac{(O-E)^2}{E}$

$$E = \frac{R \times C}{N}$$

มีข้อมูลทั้งหมด 4 ค่าดังนี้

1. O = 8, R = 8, C = 10, E = $\frac{8 \times 10}{20}$ = 4

2. O = 0, R = 8, C = 10, E = $\frac{8 \times 10}{20}$ = 4

3. O = 2, R = 12, C = 10, E = $\frac{12 \times 10}{20}$ = 6

4. O = 10, R = 12, C = 10, E = $\frac{12 \times 10}{20}$ = 6

$$\chi^2 = \frac{(8-4)^2}{4} + \frac{(0-4)^2}{4} + \frac{(2-6)^2}{6} + \frac{(10-6)^2}{6}$$

$$= 4 + 4 + 2.67 + 2.67 = 13.34$$

จากค่าไคสแควร์ที่เปิดได้จากตารางเท่ากับ 6.635 และค่าไคสแควร์ที่คำนวณได้เท่ากับ 13.34 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ที่เปิดได้จากตาราง จึงสรุปได้ว่า ปฏิเสธ H_0 ยอมรับ H_1 นั่นคือ เทคนิคแลมป์สามารถตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved