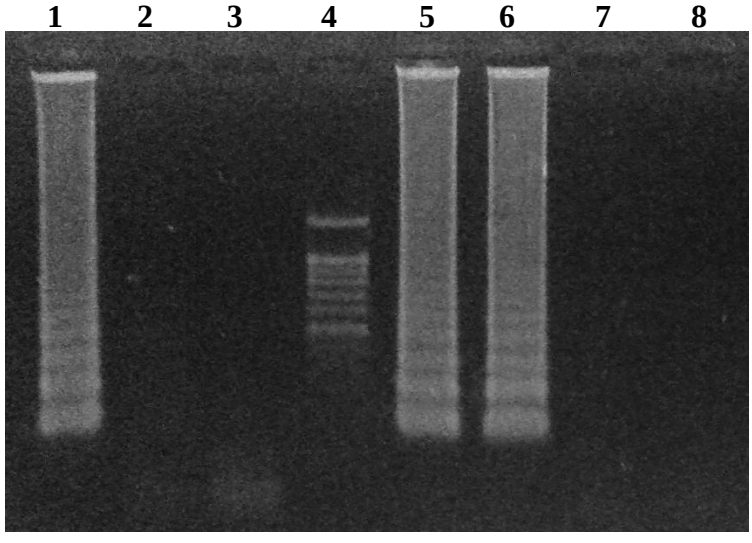
บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค LAMP ในตัวอย่างเลือดมนุษย์

การศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ผู้ศึกษาได้ใช้ตัวอย่างเลือดมนุษย์ที่สกัดด้วยวิธี Chelex มาทำการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคโดยตรวจวัดหายีน Amelogenin Y ซึ่งใช้ตัวอย่างเลือดมนุษย์สกัดจำนวน 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศชาย 15 ตัวอย่าง เพศหญิง 15 ตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดมาคละกันแล้วทำการทดสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์แบบสุ่ม เพื่อตรวจวัดหายีน Amelogenin Y สำหรับการแยกเพศ จากนั้นดูผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2% gel agarose ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ผู้ศึกษาได้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของเพศชายเป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของเพศหญิงกับน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบ ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตาราง 2 และลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคแลมป์ที่ได้ทำการตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสได้แสดงไว้ดังภาพ 19



ภาพ 19 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification
Lane 1 Positive Control, Lane 2 Negative Control, Lane 3 Negative H_2O,
Lane 4 100 bp ladder, Lane 5 and 6 Positive tests, Lane 7 and 8 Negative tests

ตาราง 2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการระบุเพศด้วยเทคนิค LAMP กับตัวอย่างเลือดมนุษย์

Sample NO.	Test	Sample Code	Sample Sex
1	N	54-001	F
2	N	54-002	F
3	N	54-003	F
4	N	54-004	F
5	P	54-005	M
6	P	54-006	M
7	P	54-007	M
8	P	54-008	M
9	P	54-009	M
10	P	54-010	M
11	P	54-011	M
12*	S	54-012	F
13	P	54-013	M
14	N	54-014	F
15	P	54-015	M

หมายเหตุ

P คือ Positive หมายถึง ตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

N คือ Negative หมายถึง ตรวจไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

S คือ Smear หมายถึง สรุปไม่ได้ว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจริง (False Positive)

* คือ ได้ทำการทดสอบซ้ำแล้วทั้งหมดสามซ้ำ

F คือ Female

M คือ Male

ตาราง 2 (ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพการระบุเพศด้วยเทคนิค LAMP กับตัวอย่างเลือดมนุษย์

Sample NO.	Test	Sample Code	Sample Sex
16	P	54-017	M
17	N	54-018	F
18	N	54-019	F
19	P	54-020	M
20	P	54-021	M
21	P	54-022	M
22	P	54-023	M
23	P	54-024	M
24	N	54-026	F
25	N	54-030	F
26	N	54-033	F
27	N	54-034	F
28	N	54-036	F
29	N	54-038	F
30	N	54-040	F

หมายเหตุ

P คือ Positive หมายถึง ตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

N คือ Negative หมายถึง ตรวจไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

S คือ Smear หมายถึง สรุปไม่ได้ว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจริง (False Positive)

* คือ ได้ทำการทดสอบซ้ำแล้วทั้งหมดสามซ้ำ

F คือ Female

M คือ Male

ตาราง 3 เปรียบเทียบผลการทดสอบการระบุเพศในตัวอย่างเลือดมนุษย์ด้วยเทคนิค LAMP

Sex determination result	Sample Sex		Total
	Male	Female	
Positive	15	1	16
Negative	0	14	14
Total	15	15	30

จาก ตาราง 3 เปรียบเทียบผลการทดสอบการระบุเพศในตัวอย่างเลือดมนุษย์จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคแลมป์แสดงให้เห็นว่า ผลการตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เป็นเพศชายทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ให้ผลบวกทั้ง 15 ตัวอย่าง และให้ผลลบศูนย์ตัวอย่าง สำหรับผลการตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงจำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ผลบวกหนึ่งตัวอย่าง โดยที่มีแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ Smear ซึ่งถือว่าเป็น false positive และผลลบ 14 ตัวอย่าง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์สามารถคำนวณค่า Performance Characteristics และ ทดสอบสมมติฐานด้วยไคสแควร์ (Chi-Square) ได้ดังนี้

ค่า Performance Characteristics

Sensitivity (ความไวของการทดสอบ)

คือ โอกาสที่การทดสอบ Amelogenin Y gene ในเพศชาย จะได้ผลบวก (positive)

$= 15 \div 15 = 1 = 100\ \%$

Specificity (ความจำเพาะของการทดสอบ)

คือ โอกาสที่การทดสอบ Amelogenin Y gene ในเพศหญิง จะได้ผลลบ (negative)

$= 14 \div 15 = 0.93 = 93\%$

False Negative Rate (อัตราผลลบเท็จ)

คือ โอกาสที่การทดสอบ Amelogenin Y gene ในเพศชาย จะได้ผลลบ (negative)

$= 0 \div 15 = 0 = 0\%$

False Positive Rate (อัตราผลบวกเท็จ)

คือ โอกาสที่การทดสอบ Amelogenin Y gene ในเพศหญิง จะได้ผลบวก (positive)

$= 1 \div 15 = 0.07 = 7\%$

Predictive Value Positive

คือ โอกาสที่ผู้ได้ผลตรวจบวก (positive) จะเป็นเพศชาย

= 15÷16 = 0.94 = 94%

Predictive Value Negative

คือ โอกาสที่ผู้ได้ผลตรวจลบ (negative) จะไม่ใช่เพศชาย

= 14 ÷ 14 = 1 = 100%

ทดสอบสมมติฐานด้วยไคสแควร์

จากสมมติฐาน

H_0 = เทคนิคแลมป์สามารถตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในเพศชายและเพศหญิงได้ผลไม่แตกต่างกัน

H_1 = เทคนิคแลมป์สามารถตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในเพศชายและเพศหญิงได้ผลแตกต่างกัน

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 ซ) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01, df = 1 = 6.635

หาค่าตัวแปรสำหรับการทดสอบไคสแควร์แสดงไว้ในตาราง 4

ตาราง 4 ตารางค่าตัวแปรคำนวณ Chi-square

O	$E = \frac{R \times C}{N}$	$(O-E)^2$	$X^2 = \sum \frac{O-E^2}{E}$
15	8	49	6.125
1	8	49	6.125
0	7	49	7
14	7	49	7
-	-	-	26.25

เมื่อ R = ผลค่าความถี่ในแถว

C = ผลค่าความถี่ในคอลัมน์

N= ผลรวมค่าความถี่ทั้งหมด

O = ค่า Observation ได้จากตาราง

E = ค่า Expectation ได้จากการคำนวณ

จากค่าไคสแควร์ที่เปิดได้จากตารางเท่ากับ 6.635 และค่าไคสแควร์ที่คำนวณได้เท่ากับ 26.25 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ที่เปิดได้จากตาราง จึงสรุปได้ว่า ปฏิเสธ H_0 ยอมรับ H_1 นั่นคือ เทคนิคแลมป์สามารถตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์พบว่า condition ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด Amelogenin Y gene คือ แช่อบที่ 63 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยา (inactivate) ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และ protocol ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด Amelogenin Y gene เป็นดังนี้

ตาราง 5 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP

Chemical	Final Concentrate	Stock	Volume/ 1 tube
H_20	-	-	10 µl
10X Buffer	1X	10X	2.5 µl
Betaine	0.8 M	5M	4 µl
dNTPs	0.4 mM each	2.5 mM each	4 µl
Primer Mix	FIP&BIP 1.6 µM each	16 µM each	
	F3&B3 0.2 µM each	2 µM each	2.5 µl
Bst.	8 U/ µl	8 U/ µl	1 µl
Template	-	-	1 µl
Total	-	-	25 µl

จากตารางที่ 5 H_2O ใช้น้ำกลั่น DW ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ในส่วนของ10X buffer นั้นมีส่วนประกอบในความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1X ดังต่อไปนี้ 20 mM Tris-HCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100, pH 8.8 @ 25 ℃

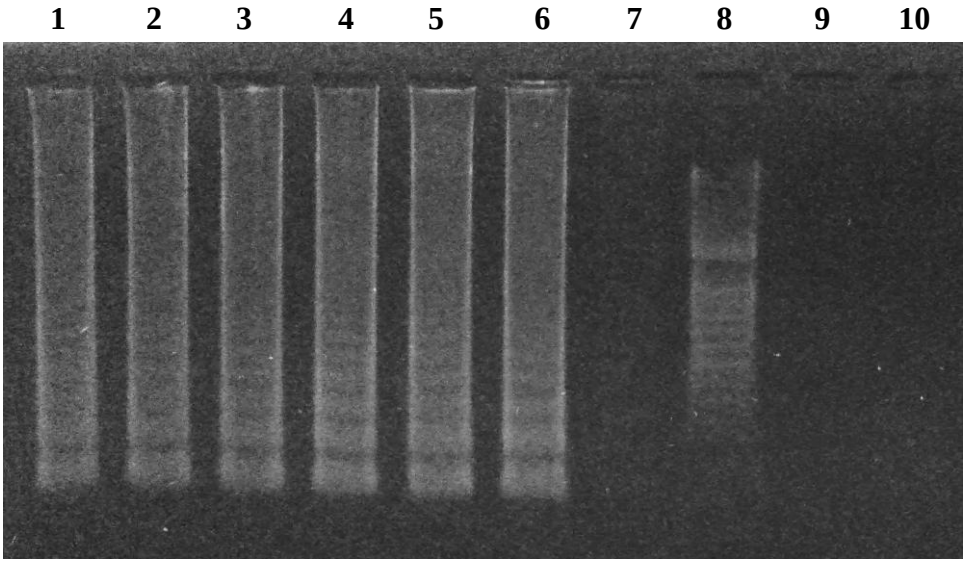
ในส่วนของไพรเมอร์นั้นใช้อัตราส่วน Outer Primer: Inner Primer เป็น 1/8

สำหรับ *Bst*. DNA polymerase นั้น สามารถเจือจางได้มากที่สุด 2 เท่า เหลือ 0.16 U/µl ในความเข้มข้นสุดท้าย (final concentrate) แต่การเจือจางทำให้ได้ผลการทดลองที่ไม่แน่นอน จึงสมควรใช้ 0.32 U/µl ในความเข้มข้นสุดท้ายเช่นเดิม

สำหรับ betaine นั้น สามารถทำการเจือจางให้เหลือ 0.4 M ได้

ผลการทดสอบความไวของเทคนิค LAMP ในตัวอย่างเลือดมนุษย์

การศึกษาความไวของเทคนิคแลมป์ในตัวอย่างเลือดมนุษย์ ผู้ศึกษาได้ทำการทดสอบความไวของเทคนิคด้วยตัวอย่างเลือดมนุษย์ที่ใช้วิธีสกัดแบบฟีนอลคลอโรฟอร์ม (Phenol Chloroform) และนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop จากนั้นจึงนำมาทำการเจือจางดีเอ็นเอเป็น 2, 4, 6, 8, 10 และ12 เท่า ตามลำดับ แล้วจึงนำไปทำการทดสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ดังตาราง 6 และภาพ 20



ภาพ 20 ผลการทดสอบความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification

หมายเหตุ	Lane 1	Positive undiluted
	Lane 2	Positive diluted 1/2
	Lane 3	Positive diluted 1/4
	Lane 4	Positive diluted 1/6
	Lane 5	Positive diluted 1/8
	Lane 6	Positive diluted 1/10
	Lane 7	Positive diluted 1/12
	Lane 8	100 bp ladder
	Lane 9	Negative H_2O
	Lane 10	Negative Undiluted

ตาราง 6 ผลการทดสอบความไวของเทคนิค LAMP ในตัวอย่างเลือดมนุษย์

Sample	Und.	D.1/2	D.1/4	D.1/6	D.1/8	D.1/10	D.1/12
Pos. control	P	P	P	P	P	P	N
Neg. control	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ปริมาณดีเอ็นเอ	2261 ng	1130.5 ng	565.25 ng	282.625 ng	141.3125 ng	70.5625 ng	35.328125 ng

หมายเหตุ P คือ Positive หมายถึง ตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

N คือ Negative หมายถึง ตรวจไม่พบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ND คือ not determined

Und. คือ Undiluted

D. คือ Diluted

จากตาราง 6 ผลการทดสอบความไวของเทคนิคพบว่าปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 70.5625 นาโนกรัมจนถึง 2261 นาโนกรัม ยังสามารถตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์ในอะกาโรสเจลได้อยู่ แต่ปริมาณดีเอ็นเอ 35.328125 นาโนกรัมลงไปไม่สามารถตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์ในอะกาโรสเจลได้