บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. microcentrifuge tube ขนาด 0.2 , 0.5 และ 1.5 ml

2. ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ

3. ปิเปต

4. บีกเกอร์ (Beaker)

5. กระบอกตวง

6. ถุงมือ

7. เครื่องชั่งสาร

8. forcep

9. electrophoresis set

10. hot plate stirrer

11. เครื่องเขย่า (Shaker)

12. ถาดสำหรับการย้อมเจล

13. เครื่องอบแห้งเจล (Gel dryer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

14. เครื่องเขย่าวน (Vortex)

15. pH meter

16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

17. เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycler)

18. water bath / heat block

19. กระดาษปอนด์

20. timer

สารเคมีในการทดลอง

1. sterile water

2. chelex

3. 6 % sodium hypochlorite

4. proteinase K

5. 2.5 µM primer mix (D3S1358)

6. acrylamide

7. JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix (SIGMA®)

8. 10x gel buffer

9. ammoniumpersulfate

10. glycerol

11. tetramethylethylenediamine (TEMED)

12. 65 % nitric acid

13. silver nitrate

14. sodium carbonate

15. 37 % formaldehyde

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16. 100 % glacial acetic acid

17. boric acid

18. N,N’-methylene bisacrylamide

19. sulfuric acid

20. 1x TBE buffer

21. D3S1358 ladder

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

การทดลองประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1. การทดลองเบื้องต้น (ทดลองภายในห้องปฏิบัติการ) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการทดลองในสภาวะเหมือนจริง

2. การทดลองในสภาวะเสมือนจริง

ในการวิจัยประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

2. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

3. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

4. ขั้นตอนการแยกแถบดีเอ็นเอในโดย polyacrylamide gel electrophoresis

5. การแปลผล

การทดลองเบื้องต้น

การทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1. ทดสอบการตรวจดีเอ็นเอจากฝ่ามือ

2. ทดสอบเบื้องต้นในการตรวจดีเอ็นเอสัมผัส (Touch DNA) จากหลอด microcentrifuge ในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

การทดลองเบื้องต้นทำการเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครจำนวน 5 คน

<u>การทดลองส่วนที่ 1</u> ทดสอบการตรวจดีเอ็นเอจากฝ่ามือ

เก็บตัวอย่างโดยการใช้ปลายสวอบแห้งเช็ดบริเวณฝ่ามือทั้งสองข้างของอาสาสมัคร โดยไม่ได้ทำการล้างมือของอาสาสมัครก่อนการเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำสวอบ ดังกล่าวแช่ไว้ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

<u>การทดลองส่วนที่ 2</u> ทดสอบเบื้องต้นในการตรวจดีเอ็นเอสัมผัสจากหลอด microcentrifuge ในห้องปฏิบัติการ

หลังจากทำการเก็บตัวอย่างจากการทดลองส่วนที่ 1 ให้อาสาสมัครแต่ละคนใช้มือทั้งสองข้างจับหลอด microcentrifuge ขนาด 0.2 ml ด้วยปลายนิ้วข้างละ 1 หลอด เป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นนำหลอด microcentrifuge ดังกล่าวใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 µl แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

เก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell) จากอาสาสมัคร โดยการใช้ไม้จิ้มฟันขูดเบาๆบริเวณกระพุ้งแก้มจากนั้นนำไม้จิ้มฟัน ดังกล่าวแช่ไว้ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไปเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากการทดลองส่วนที่ 1 และการทดลองส่วนที่ 2

mock control คือ หลอด microcentrifuge ขนาด 0.2 ml ที่ไม่ได้ถูกสัมผัสจากอาสาสมัครใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 µl แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง

ประยุกต์ใช้วิธี chelex ของ standard operation procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวชของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ {การสกัดดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell)} (ภาคผนวก ก)

3. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction

ประยุกต์ใช้วิธี ของ standard operation procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวชของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1.1 PCR mixture ปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดไว้ข้างต้น ปริมาตร 2.0 µl, sterile water 2.0 µl, JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix (SIGMA®) 5.0 µl และ 2.5 µM primer mix (ตำแหน่ง D3S1358) 1.0 µl

3.1.2 โปรแกรมการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ได้แก่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที 1 รอบ จากนั้นเข้าสู่รอบของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ คือ denature ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 10 วินาที และextension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที ทั้งหมด 40 รอบ

4. ขั้นตอนการแยกแถบดีเอ็นเอโดย polyacrylamide gel electrophoresis

ทำการตรวจสอบลักษณะของ PCR products โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Allelic ladder) ด้วยวิธีการทำ polyacrylamide gel electrophoresis (ภาคผนวก ข) และนำวุ้นที่ได้ไปย้อมด้วยวิธี silver staining (ภาคผนวก ค) เพื่อให้เห็นแถบดีเอนเอชัดเจน

5. การแปลผล

วิธีการแปลผล คือ โดยเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม กับดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองส่วนที่ 1 และการทดลองส่วนที่ 2 ว่าแสดงผลออกมาตรงกันหรือไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลองเบื้องต้น

ผลการทดลองส่วนที่ 1

ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เช็ดจากฝ่ามือของอาสาสมัครทั้งหมดสามารถแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอหลากหลาย ไม่สามารถแปลผลได้ (ภาพ 1)

ผลการทดลองส่วนที่ 2

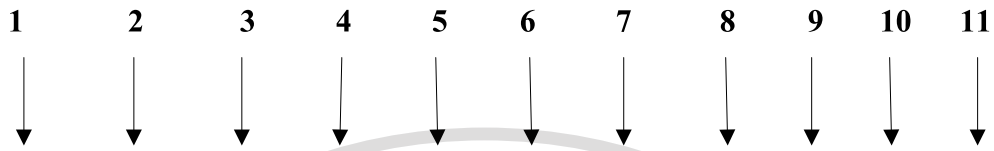
ผลการตรวจดีเอ็นเอสัมผัส (Touch DNA) จากหลอด microcentrifuge แสดงผลให้เห็น 3 แบบ (ภาพ 1) คือ

แบบที่ 1 แสดงลักษณะดีเอ็นเอตรงกับลักษณะดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม

แบบที่ 2 ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ (ให้ผลลบ)

แบบที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอหลากหลาย ไม่สามารถแปลผลได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 ผลตรวจดีเอ็นเอสัมผัส (Touch DNA) จากตัวอย่างที่เช็ดจากฝ่ามือของอาสาสมัคร และหลอด microcentrifuge

ช่องที่ 1 คือ mock control

ช่องที่ 2 และ 11 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (D3S1358 ladder)

ช่องที่ 3 และ 4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม

ช่องที่ 5 และ 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากฝ่ามือทั้งสองข้าง (ไม่สามารถแปลผลได้)

ช่องที่ 7 คือตัวอย่างดีเอ็นเอจากหลอด microcentrifuge ที่สามารถแปลผลได้ชัดเจน

ช่องที่ 8 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากหลอด microcentrifuge ที่ให้ผลลบ

ช่องที่ 9 และ 10 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากหลอด microcentrifuge (ไม่สามารถแปลผลได้)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ผลการตรวจดีเอ็นเอสัมผัสจากหลอด microcentrifuge ขนาด 0.2 ml ที่ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง D3S1358

Sample No.	ผล	Sample No.	ผล
1	+	11	*
2	-	12	-
3	*	13	*
4	*	14	*
5	+	15	-
6	*	16	*
7	*	17	*
8	*	18	*
9	-	19	*
10	*	20	*

หมายเหตุ

+ หมายถึง แสดงผลชัดเจน (ตรงกับ positive control)

- หมายถึง ให้ผลลบ

* หมายถึง แสดงผลไม่ชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อภิปรายผลการทดลอง

การทดลองส่วนที่ 1

ผลการทดลองพบว่าลักษณะดีเอ็นเอสัมผัสจากฝ่ามือทั้งสองข้างของอาสาสมัครทั้งหมดสามารถพบแถบดีเอ็นเอ แต่ไม่สามารถแปลผลได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอของบุคคลอื่น หรือฝ่ามือที่ไม่สะอาด ทำให้ได้ตัวอย่างที่ไม่สะอาด ได้ผลตรวจเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอหลายแถบจางๆ เป็นลักษณะที่ไม่สามารถแปลผลได้

การทดลองส่วนที่ 2

ผลการทดลองพบว่าลักษณะดีเอ็นเอสัมผัสจากหลอด microcentrifuge แสดงผลได้ตรงกับลักษณะดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มได้จำนวน 2 ครั้งจากการทดลองทั้งหมด 20 ครั้ง ตัวอย่างที่ให้ผลตรวจดีเอ็นเอชัดเจนทั้งสองครั้ง เกิดจากการสัมผัสหลอด microcentrifuge ครั้งที่สอง จากบุคคลทั้งสองคน ซึ่งตัวอย่างจากการจับครั้งแรกเป็นแถบดีเอ็นเอหลากหลาย ไม่สามารถแปลผลได้ จึงเชื่อว่าบุคคลทั้งสองน่าจะเป็น good shedder แต่สาเหตุที่ดีเอ็นเอสัมผัสครั้งแรกตรวจได้เป็นแถบดีเอ็นเอหลากหลาย น่าจะเกิดจากการปนเปื้อนดีเอ็นเออยู่บนปลายนิ้วมือของบุคคลดังกล่าว และหลังจากการสัมผัสครั้งแรกทำให้ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนถูกเช็ดออกไป การสัมผัสหลอด microcentrifuge ครั้งที่สอง จึงปรากฏดีเอ็นเอของอาสาสมัครติดอยู่ที่หลอด microcentrifuge จนทำให้ตรวจได้ผลชัดเจน นอกจากนั้นหลอด microcentrifuge เป็นหลอดพลาสติกผิวเรียบ และสะอาด การเช็ดเก็บตัวอย่างจึงทำได้ง่าย ทำให้มีโอกาสเจอดีเอ็นเอสูง แสดงให้เห็นว่าเทคนิคที่ใช้ในการทดลองมีความไว (Sensitivity) เพียงพอสำหรับตรวจดีเอ็นเอจากการสัมผัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองส่วนที่ 1 พบว่า การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากบุคคลอื่น หรือฝ่ามือที่ไม่สะอาด ทำให้ได้ตัวอย่างที่ไม่สะอาด มีผลทำให้เกิดลักษณะของดีเอ็นเอไม่สามารถแปลผลได้ ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงออกแบบการทดลองในสภาวะเสมือนจริง ให้อาสาสมัครล้างมือก่อนทำการเก็บตัวอย่าง

จากการทดลองส่วนที่ 2 พบว่าสามารถตรวจดีเอ็นเอสัมผัส (Touch DNA) จากผิวหลอดพลาสติก ได้ผลชัดเจนในบางตัวอย่าง แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่จะใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในการพิสูจน์บุคคลจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวของวัตถุจากการสัมผัส

<u>การทดลองในสภาวะเสมือนจริง</u>

1. ขั้นตอนการเลือก และเก็บตัวอย่าง

1.1 การกำหนดขนาดประชากร

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการประมาณสัดส่วนของการตรวจพบ และได้ผลชัดเจนของดีเอ็นเอสัมผัสจากด้ามมีดพลาสติกของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง D3S1358 จึงใช้วิธีกำหนดขนาดตัวอย่างโดยสูตร

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

โดยที่

d = ความผิดพลาดที่ผู้วิจัยจะยอมรับได้ ในที่นี้ d = $|\hat{p} - p|$

Z = ค่าจากตารางการแจกแจงแบบปกติแสดงความเชื่อมั่นของการประมาณค่า

p = สัดส่วนของสิ่งที่สนใจ

q = 1 – p

การประมาณสัดส่วนให้มีความผิดพลาดได้ไม่เกิน 5 % ด้วยความเชื่อมั่น 95 % และสัดส่วนของสิ่งที่สนใจ คือ 0.9 ดังนั้นจะต้องใช้ขนาดตัวอย่าง 144 ตัวอย่างเป็นอย่างน้อย เพราะฉะนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงกำหนดให้ทำการทดสอบ 150 ตัวอย่าง

1.2 การลดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ด้ามมีดที่ใช้ในการทดลอง

นำด้ามมีดทั้งหมดมาทำให้ปราศจากดีเอ็นเอโดยนำไปแช่ใน 6.0 % sodium hypochlorite เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การเก็บตัวอย่าง

ให้อาสาสมัครแต่ละคนล้างมือด้วยน้ำเปล่าแล้วสวมถุงมือพลาสติกเพื่อป้องกันการปนเปื้อน เมื่อครบ 15 นาที ให้อาสาสมัครถอดถุงมือข้างที่ถนัด และจับบริเวณด้ามมีดเป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นผู้วิจัยจะใช้สวอบเพื่อเช็ดที่ด้ามมีดเพื่อเก็บตัวอย่างด้วยเทคนิค double swab แล้วนำสวอบดังกล่าวแช่ไว้ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

mock control คือ ตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากสวอบที่เช็ดด้ามมีดพลาสติกที่ไม่ได้ถูกสัมผัสจากผู้ใดเลย ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างด้วยเทคนิค double swab

เก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell) จากอาสาสมัคร โดยการใช้ไม้จิ้มฟันขูดเบา ๆ บริเวณกระพุ้งแก้ม จากนั้นนำไม้จิ้มฟัน ดังกล่าว แช่ไว้ใน หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอสัมผัสจากด้ามมีดพลาสติก

2. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

2.1 การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง

ประยุกต์ใช้วิธี chelex ของ standard operation procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวชของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ {การสกัดดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell)} (ภาคผนวก ก)

3. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction

ประยุกต์ใช้วิธี ของ standard operation procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวชของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1.1 PCR mixture ปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดไว้ข้างต้นปริมาตร 2.0 µl, sterile water 2.0 µl, JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix (SIGMA®) 5.0 µl และ 2.5 µM primer mix (ตำแหน่ง D3S1358) 1.0 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 โปรแกรมการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ได้แก่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที 1 รอบ จากนั้นเข้าสู่รอบของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ คือ denature ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 10 วินาที และextension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที ทั้งหมด 40 รอบ

4. ขั้นตอนการแยกแถบดีเอ็นเอโดย polyacrylamide gel electrophoresis

ทำการตรวจสอบลักษณะของ PCR products โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Allelic ladder) ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (ภาคผนวก ข) และย้อมเจลด้วย silver staining (ภาคผนวก ค) เพื่อให้เห็นแถบดีเอนเอชัดเจน

5. การแปลผล

วิธีการแปลผล คือ ทำการเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell) กับตัวอย่างที่เช็ดจากด้ามมีดพลาสติกโดยบุคคลเดียวกัน ว่าผลออกมาตรงกันหรือไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved