บทที่ 2

วิธีการดำเนินการศึกษา

<u>สถานที่ทำการวิจัย</u>

ห้องปฏิบัติการอณูพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. Thermal cycler
2. Electrophoresis set
3. Microcentrifuge
4. Vortex
5. Microcentrifuge tube 1.5 ml
6. Microcentrifuge tube 0.5 ml
7. Micropipette ขนาด 2-20 µl
8. Micropipette ขนาด 10-100 µl
9. Micropipette ขนาด 20-200 µl
10. Micropipette ขนาด 500-1000 µl
11. water bath/heat block
12. shaker
13. Gel dryer
14. pH meter
15. hot plate stirrer
16. นาฬิกาจับเวลา
17. ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ
18. ถุงมือ
19. ถาดสำหรับการย้อมเจล
20. forcep

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องแก้ว

1. Beaker 50 ml
2. Beaker 250 ml
3. Beaker 500 ml
4. Beaker 1000 ml

สารเคมี

การสกัดดีเอนเอ

1. Chelex resin
2. Enzyme proteinase K

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. Primer mix โดยความเข้มข้นของ primer = 8 μM สำหรับ vWA และ 5 μM สำหรับ DYS385 โดย sequence ของ primer คือ

vWA locus

Forward primer: 5'-CCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATG-3'

Reverse primer: 5'-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'

DYS385 locus

Forward primer: 5' GAG AAA GAG GAA AGA GAA AGA AGAG3'

Reverse primer: 5' ATC TAT TCC AAT TAC ATA GTC CTCC3'

2. น้ำกลั่น
3. JumpStart™ REDTaq® จากบริษัท SIGMA
4. น้ำสกัดดีเอนเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการแยกแถบดีเอนเอด้วย Polyacrylamide gel Electrophoresis

1. Acrylamide
2. N,N'- methylenebisacrylamide
3. Tris (hydroxymethyl) aminomethane
4. Silver nitrate
5. Boric acid
6. Sodium carbonate
7. Glycerol
8. Glacial acetic acid
9. Nitric acid
10. Formaldehyde
11. Ammoniumpersulfate
12. Tetramethylethylenediamine (TEMED)

<u>วิธีการทดลอง</u>

<u>การคำนวณขนาดตัวอย่างที่จะทำการศึกษา</u>

เนื่องจากงานค้นคว้าแบบอิสระนี้เกี่ยวข้องกับกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน ข้อมูลที่ได้เป็นแบบไม่ต่อเนื่อง และวัดค่าผลการทดลองในรูปสัดส่วน (proportion) จึงใช้สูตรในการคำนวณขนาดตัวอย่าง คือ

$$n = \frac{\left(Z\alpha\sqrt{PcQc} + Z\beta\sqrt{PtQt}\right)^2}{(Pc - Pt)^2}$$

Z_α = ค่า Z ที่ได้จากตารางมาตรฐาน เมื่อกำหนดความเชื่อมั่น 95% = 1.96

Z_β = ค่า Z ที่ได้จากตารางมาตรฐาน เมื่อกำหนด power of the test 90% = 1.28

P_t = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มศึกษา = 0.90

P_c = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มควบคุม = 0.71

$Q_c = 1 - Pc = 0.29$

$Q_t = 1 - Pt = 0.10$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม(N) = $\frac{\left(1.96\sqrt{(0.71)(0.29)} + 1.28\sqrt{(0.90)(0.10)}\right)^2}{(0.71-0.90)^2}$

= 44.89 ~ 45

ดังนั้นจะต้องใช้ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม กลุ่มละ 45 ตัวอย่าง เป็นอย่างน้อย ในการทดลองนี่ใช้กลุ่มตัวอย่างกลุ่มละ 50 ตัวอย่าง

<u>การเก็บตัวอย่าง</u>

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการทดลองคือ ตัวอย่างเนื้อเยื่อใต้เล็บของอาสาสมัคร หญิงที่ข่วนอาสาสมัครชายตามวิธีที่กำหนดที่ละครั้งรวม 50 ครั้ง ทำให้ได้ตัวอย่างเพื่อทำการทดลอง 50 ตัวอย่าง

วิธีเตรียมอาสาสมัครเพื่อเก็บตัวอย่าง

- ใช้อาสาสมัครหญิงที่มีความยาวเล็บประมาณ 2 มิลลิเมตร
- ทำความสะอาดเล็บของอาสาสมัครหญิงด้วยการล้างมือฟอกสบู่ก่อนการข่วน
- อาสาสมัครหญิงทำการข่วนที่บริเวณท้องแขนหรือต้นแขนของอาสาสมัครชาย โดยมีข้อกำหนดดังนี้
  - ข่วน 3 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง
  - ข่วนด้วยความเร็ว 6 นิ้วใน 2 วินาที
  - ข่วนด้วยความแรงให้เป็นรอยแดงเท่านั้นโดยไม่มีเลือดออก

วิธีเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากเล็บ

หลังจากเสร็จสิ้นการข่วนแล้วจะ

- ใช้ไม้จิ้มฟันปลายแหลมขูดเบาๆ บริเวณด้านในเล็บมือของอาสาสมัครหญิง
- นำไม้จิ้มฟันที่ขูดขี้เล็บแช่ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml ตั้งทิ้งไว้สลับกับการเขย่าเบาๆนาน 15–30 นาที เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อในเล็บ

ประยุกต์ใช้จากวิธีของ Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอนเอสำหรับงานนิติเวชของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1. นำ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำแขวนลอยของเนื้อเยื่อดังกล่าวไปปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะได้ตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดน้ำชั้นบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน

2. ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้ง ดูดน้ำชั้นบนทิ้ง เหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด

3. เติมเม็ด chelex resin ลงไปพอท่วมตะกอน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป ประมาณ 200 µl จากนั้นเติมสารละลาย proteinase K (10 mg/ml) ลงไป 2 µl ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ

4. แช่อบที่อุณหภูมิ 37 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปเขย่าวนประมาณ 5-10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที แล้วนำหลอดทดลองไปต้มเดือดนาน 8 นาที

5. นำไปเขย่าวนอีก 10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอนเอแม่แบบสำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 °C หรือแช่แข็งก็ได้

6. เมื่อต้องการนำน้ำสกัดดีเอนเอกลับมาใช้ใหม่ ให้ดำเนินตามขั้นตอนที่ 5 ตามต้องการ

การเตรียม positive control และ negative control

Positive control ได้จากการนำ Buccal cell ของอาสาสมัครชายและหญิงมาสกัดดีเอนเอตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอนเอสำหรับงานนิติเวชของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Negative control (Mock control) เป็นตัวอย่างควบคุมที่มีสภาพใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมากที่สุด เตรียมโดยขูดเนื้อเยื่อใต้เล็บของอาสาสมัครหญิงก่อนทำการข่วนและนำไปสกัดดีเอนเอเช่นเดียวกับตัวอย่างอื่นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)</u>

ประยุกต์ใช้จากวิธีของ Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอนเอสำหรับงานนิติเวชของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโครโมโซมเพศตำแหน่ง DYS385 โดยใช้ primer ดังนี้

Forward primer: 5'-GAG AAA GAG GAA AGA GAA AGA AGAG-3'

Reverse primer: 5'-ATC TAT TCC AAT TAC ATA GTC CTCC-3'

[Bhoopat *et al*. 2003]

PCR mixture ปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย

น้ำสกัดดีเอนเอ (DNA Template)	1.0 µl
5 µM, Primer mix (ตำแหน่ง DYS 385)	1.0 µl
น้ำกลั่น	3.0 µl
JumpStart^{TM} REDTaq$^{®}$	5.0 µl

มี PCR condition ดังนี้

Initial denaturation ที่ อุณหภูมิ 94ºc นาน 2 นาที จากนั้น

- Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94ºc	20 วินาที
- Annealing	ที่อุณหภูมิ 53ºc	30 วินาที
- Extension	ที่อุณหภูมิ 72ºc	30 วินาที ทั้งหมด 32 รอบ

2. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโครโมโซมร่างกายตำแหน่ง vWA โดยใช้ primer ดังนี้

Forward primer: 5'-GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG-3'

Reverse primer: 5'-CCC TAG TGG ATG ATA AGA ATA ATC-3'

[ธานินทร์, 2542]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

PCR mixture ปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย

น้ำสกัดดีเอนเอ (DNA Template๗	1.0 µl
8 µM Primer mix (ตำแหน่ง vWA)	1.0 µl
น้ำกลั่น	3.0 µl
JumpStart™ REDTaq®	5.0 µl

มี PCR condition ดังนี้

Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที จากนั้น

- Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C	1 นาที
- Annealing ที่อุณหภูมิ 58 °C	1 นาที
- Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C	1 นาที ทั้งหมด 32 รอบ

ในการทดลองจะต้องทำพร้อมกับตัวอย่างควบคุมทั้งผลบวก (Positive control) และผลลบ (Negative control) ทุกครั้ง เพื่อป้องกันผลบวกปลอมที่เกิดจากการปนเปื้อนในส่วนผสมต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และผลลบปลอมที่อาจเกิดจากความผิดพลาดในส่วนของน้ำยาและขั้นตอนการทำ

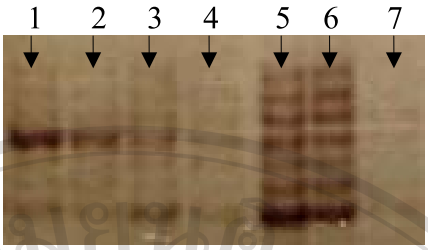
<u>การตรวจสอบผล PCR</u>

ผลผลิต PCR ทุกตัวอย่างจะถูกกำหนดลักษณะทางพันธุกรรมโดยเทียบกับดีเอนเอมาตรฐาน (Allelic ladder) ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis และการย้อมเจลด้วย silver staining เพื่อให้เห็นแถบดีเอนเอชัดเจน (ภาคผนวก ข)

<u>การแปลผลการตรวจดีเอนเอ</u>

การแปลผลตรวจดีเอนเอบนโครโมโซมร่างกายตำแหน่ง vWA ใช้ข้อกำหนดว่าถ้าตรวจพบดีเอนเอของอาสาสมัครชายเด่นชัดออกมา หมายความว่า การตรวจนั้นได้ผลชัดเจน หากตรวจไม่พบดีเอนเอของอาสาสมัครชายหรือปรากฏแถบดีเอนเอหลายแถบซ้อนกัน (Stutter band) จะถือว่าไม่ได้ผลชัดเจน ดังแสดงในภาพ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 แสดงผลตรวจดีเอนเอบนโครโมโซมร่างกาย ตำแหน่ง vWA

ช่อง 1, 2, 3 = ได้ผลชัดเจน (ตรวจพบดีเอนเอ vWA ของอาสาสมัครชาย)

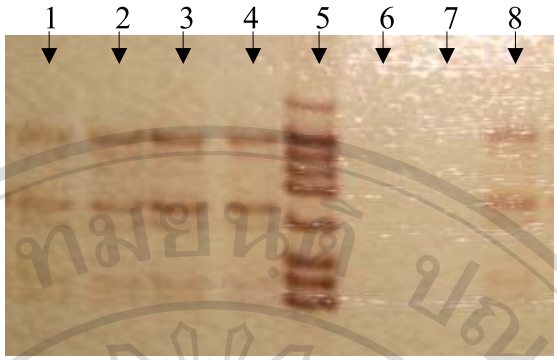
ช่อง 4, 7 = ไม่ได้ผลชัดเจน (ไม่พบดีเอนเอ vWA ของอาสาสมัครชาย)

ช่อง 5 = ไม่ได้ผลชัดเจนในลักษณะที่ปรากฏแถบดีเอนเอหลายแถบซ้อนกัน (Stutter Band)

ช่อง 6 = อัลลีลมาตรฐานตำแหน่ง vWA ประกอบด้วยอัลลีล 14 - 20

ส่วนการแปลผลตรวจดีเอนเอบนโครโมโซมเพศชายตำแหน่ง DYS385 ใช้เกณฑ์การแปลผลเช่นเดียวกับตำแหน่ง vWA อย่างไรก็ตามจากการทดลองไม่มีตัวอย่างใดที่ให้ลักษณะแถบดีเอนเอหลายแถบซ้อนกัน (Stutter band) ที่ถือว่าไม่ได้ผลชัดเจน ดังแสดงในภาพ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 แสดงผลการตรวจดีเอนเอบนโครโมโซมเพศชายตำแหน่ง DYS385

ช่อง 1, 2, 3, 4 คือ ได้ผลชัดเจน (พบดีเอนเอ DYS385 ของอาสาสมัครชายมีลักษณะตรงกับตัวควบคุมผลบวก)

ช่อง 6 คือ ไม่ได้ผลชัดเจน (ไม่พบดีเอนเอ DYS385 ของอาสาสมัครชาย)

ช่อง 5 คือ อัลลีลมาตรฐานตำแหน่ง DYS385 ประกอบด้วยตำแหน่ง 10-12, 14, 16-19, 21

ช่อง 7 คือ ตัวควบคุมผลลบ (Mock Control)

ช่อง 8 คือ ตัวควบคุมผลบวก (Positive Control)

การวิเคราะห์ผล

ศึกษาสัดส่วนการตรวจ ได้ผลชัดเจนของ ดีเอนเอ ไมโครแซทเทลไลท์บน โครโมโซมเพศชาย ตำแหน่ง DYS385 เปรียบเทียบ กับดีเอนเอ ไมโครแซทเทลไลท์บน โครโมโซมร่างกายคู่ที่ 12 ตำแหน่ง vWA ว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ใช้การทดสอบสมมติฐานโดย McNemar' s Chi-square test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved