บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการอณูพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. microcentrifuge tube ขนาด 0.2 , 0.5 และ 1.5 ml
2. ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ
3. ปิเปต
4. ถุงมือ
5. บีกเกอร์ (Beaker)
6. กระบอกตวง
7. forcep
8. เครื่องชั่งสาร
9. Electrophoresis set
10. Hot plate stirrer
11. เครื่องเขย่า (Shaker)
12. ถาดสำหรับการย้อมเจล
13. เครื่องอบแห้งเจล (Gel dryer)
14. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
15. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
16. pH meter
17. เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการทำ PCR (Thermal cycler)
18. เครื่องตรวจหาลำดับเบส
19. Water bath / Heat block
20. กระดาษปอนด์
21. นาฬิกาจับเวลา
22. เครื่องชั่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. Proteinase K
4. 10X Taq buffer
5. 2.5 μM Primer mix (DXS7130)
6. dNTPs
7. Taq DNA polymerase
8. Acrylamide
9. Tris buffer pH 8.5
10. 10X Gel buffer

11. Ammoniumpersulfate
12. 95% Ethanol
13. Glycerol
14. 100 bp ladder
15. Tetramethylethylenediamine (TEMED)
16. 65% Nitric acid
17. Silver nitrate
18. Sodium carbonate
19. 37% Formaldehyde
20. 100% Glacial acetic acid
21. 1X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer
22. 4M Ammonium acetate
23. 50% Isopropanol
24. 70% Ethanol
25. 100% Ethanol
26. Sulfuric acid
27. 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer
28. Agarose power
29. Ethidium bromide
30. 3M Sodium acetate
31. Hidi (formamide)
32. Big Dye Kit
33. Dilution Buffer
34. 3.2 µM Primer (DXS7130)
35. Boric acid
36. N,N'methylenebisacrylamide
37. 10 mM Tris (Hydroxymethyl methylamine) Ultraviolet pH 8. 5

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

1.1 การกำหนดขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาที่เกี่ยวกับการประมาณค่าสัดส่วนประชากร ดังนั้นจึงกำหนดขนาดตัวอย่างด้วยวิธีการประมาณค่าสัดส่วนของประชากร ซึ่งมีสูตรการหาขนาดตัวอย่าง (n) ดังนี้ [มานัส, 2549]

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

เมื่อ n = ขนาดตัวอย่าง (โดยตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษา คือ อัลลีล)

Z = 1.96 (ความเชื่อมั่น 95%)

p = 0.586 {ความน่าจะเป็นของอัลลีลสูงสุดในตำแหน่ง DXS7130 (Zeng *et al*., 2009)}

q = (1 – p) นั่นคือ 1-0.586 = 0.414

E = 0.05 (ให้ความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 5 %)

แทนค่าในสูตรได้ $n = \frac{(1.96)^2x(0.586)x(0.414)}{(0.05)^2}$

$n = 372.79 \sim 373$

ดังนั้นขนาดกลุ่มตัวอย่าง ที่ต้องใช้ในงานวิจัย ควรจะไม่น้อยกว่า 373 อัลลีล หรือ ไม่น้อยกว่า 187 คน (1 คนมี 2 อัลลีล)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากมีการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 423 คน [Bhoopat *et al*., 2006] และศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 110 คน [Bhoopat *et al*., 1997] เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบความเหมือนกันของสัดส่วนประชากร (Test of homogeneity) ดังนี้ [มานัส, 2549]

ตาราง 1 แสดงจำนวนอัลลีลที่ได้จากการสังเกตในการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยของทั้งสองกลุ่ม

อัลลีลที่พบ	จำนวนอัลลีล		รวม (อัลลีล)
	n = 423 คน (846 อัลลีล)	n = 110 คน (220 อัลลีล)	
6	93	26	119
7	290	67	357
8	46	10	56
9	309	88	397
10	104	28	132
11	4	1	5
รวม(อัลลีล)	846	220	1066

ขั้นตอนและวิธีทดสอบ

1. สมมติฐาน

H_0 : สัดส่วนประชากรในไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน

H_1 : สัดส่วนประชากรในไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยทั้งสองกลุ่มแตกต่างกัน

2. คำนวณค่าสถิติที่ใช้ในการทดสอบคือ

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{2}\sum_{j=1}^{6}\frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

โดยคำนวณค่าความถี่คาดหวังจาก

$$Eij = RxC / n$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 แสดงจำนวนอัลลีลคาดหวัง (Eij) ในการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยของทั้งสองกลุ่ม

อัลลีลที่พบ	จำนวนอัลลีล		รวม (อัลลีล)
	n = 423 คน (846 อัลลีล)	n = 110 คน (220 อัลลีล)	
6	94.44	24.56	119
7	283.32	73.68	357
8	44.44	11.56	56
9	315.07	81.93	397
10	104.76	27.24	132
11	3.97	1.03	5
รวม(อัลลีล)	846	220	1066

ดังนั้น $\chi^2 = \sum_{i=1}^{2}\sum_{j=1}^{6}\frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$

$\chi^2 = 0.022 + 0.1575 + \ldots + 0.0009$

$\chi^2 = 1.7292$

3. กำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05
4. หาเขตวิกฤต ที่ d.f = (6-1)(2-1) = 5 ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยจะปฏิเสธ H_0 ก็ต่อเมื่อค่าที่ได้จากการคำนวณมากกว่าค่าเขตวิกฤต เมื่อเปิดตารางจะได้ $\chi^2 = 11.07$

เนื่องจากค่าที่คำนวณได้ ($\chi^2 =$ 1.7292) น้อยกว่าค่าเขตวิกฤต ($\chi^2 = 11.07$) จึงสรุปได้ว่าไม่ปฏิเสธ H_0 นั้นคือสัดส่วนประชากรในไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้กลุ่มตัวอย่างจำนวน 120 คน เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการทำการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การเก็บตัวอย่าง

1.2.1 กลุ่มตัวอย่าง

- กลุ่มตัวอย่างในการทดลองคือ ประชากรเพศหญิงที่ไม่ความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดและเป็นประชากรทางภาคเหนือของประเทศไทย (ขอบเขตของประชากรภาคเหนือใน

การศึกษาคือ ผู้ที่มีบิดาและมารดาเป็นคนภาคเหนือทั้ง 17 จังหวัด) โดยพิจารณาจากการสอบถามข้อมูลก่อนการเก็บตัวอย่าง

1.2.2 วิธีเก็บตัวอย่าง

- เก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell) จากกลุ่มตัวอย่าง โดยการใช้ไม้จิ้มฟันเช็ดเบาๆบริเวณกระพุ้งแก้มภายในปากของกลุ่มตัวอย่าง

- นำไม้จิ้มฟันที่เช็ดภายในปากของกลุ่มตัวอย่างแช่ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

2. การสร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell) [วิฑูรย์และธานินทร์, 2005]

2.1.1) นำ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มจากกลุ่มตัวอย่างข้างต้น

2.1.2) ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาทีจะได้ตะกอนสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ดูดน้ำชั้นบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน

2.1.3) ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้งดูดซับน้ำชั้นบนทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด

2.1.4) เติมเม็ด chelex resin ลงไปพอท่วมตะกอนแล้วเติมน้ำกลั่นลงไป ประมาณ 200 µl และเติม proteinase K (10 mg/ml) 2 µl ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ

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

2.1.6) นำไปเขย่าวนอีก 10 นาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 °C หรือแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ให้ดำเนินตามขั้นที่ 2.1.6 ตามต้องการ

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR [วิฑูรย์และธานินทร์, 2005]

2.2.1) PCR mixture ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดไว้ข้างต้น ปริมาตร 2.0 µl, Sterile water 10.0 µl, 1mMdNTPs 2.0 µl, 10X taq buffer 2.0 µl, 0.25 u/ml Taq DNA polymerase 2.0 µl และ 2.5 µM Primer mix (ตำแหน่ง DXS7130) 2.0 µl โดย primer mix มีลำดับเบสดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Primer F : 5’- AGCCATTTGGAATATAGAGGAAGGG -3’

Primer R : 5’- AGGACTGGGAAAGAACAAAGCAAGG -3’

ซึ่งอ้างอิงจาก GenBank (ดังแสดงในภาคผนวก ฉ)

2.2.2) โปรแกรมการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้แก่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที 1 รอบ จากนั้นเข้าสู่รอบของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ คือ denature ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 10 วินาที และextension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที ทั้งหมด 35 รอบ

2.3 ตรวจสอบผล PCR ที่ได้ด้วยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis [วิฑูรย์และธานินทร์, 2005] เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (20 bp ladder) จากนั้นนำมาย้อมสีเจลด้วย silver staining [Budowle *et al*. 1991] (ภาคผนวก ก) เพื่อให้เห็นแถบ DNA ชัดเจน

2.4 สร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders)

2.4.1) ตัดแถบ DNA ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วทีละแถบ โดยจะเลือกแถบที่เคลื่อนที่ไปหยุดในตำแหน่งต่างกันเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.4.2) สกัดแถบ DNA

- นำแถบ DNA ที่ตัดออกมาแล้วบดให้ละเอียดด้วย forcep ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml
- ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะได้ตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดน้ำชั้นบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน
- ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้งดูดซับน้ำชั้นบนทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด
- เติมเม็ด chelex resin ลงไปพอท่วมตะกอนแล้วเติมน้ำกลั่นลงไป ประมาณ 200 µl ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ
- แช่อบที่อุณหภูมิ 37 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปเขย่าวนประมาณ 5-10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที แล้วนำหลอดทดลองไปต้มเดือดนาน 8 นาที
- นำไปเขย่าวนอีก 10 นาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 °C หรือแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ให้เขย่าวนอีก 10 นาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.3) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามขั้นตอนที่ 2.2 จากนั้นนำมาตรวจผล PCR ด้วยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis [วิฑูรย์และธานินทร์, 2005] เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (20 bp ladder)

2.5 หาลำดับเบสของแต่ละอัลลีลในตำแหน่ง DXS7130 ด้วยเครื่องอัตโนมัติ

2.5.1) นำตัวอย่างแถบ DNA ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามขั้นตอนที่ 2.4.3 มาตกตะกอนด้วยวิธี isopropanol precipitation (ภาคผนวก ก)

2.5.2) แบ่งตัวอย่างแถบ DNA ที่ตกตะกอนเสร็จแล้วประมาณ 5 µl มาเข้ากระบวนการ agarose electrophoresis (ภาคผนวก ก) เพื่อดูความเข้มของแถบ DNA

2.5.3) นำตัวอย่างแถบ DNA ที่เหลือจากขั้นตอนที่ 2.5.2 มาทำปฏิกิริยาหาลำดับเบส (Sequencing reaction) ด้วยเทคนิค PCR ปริมาตรรวม 20 µl ที่ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดไว้ข้างต้น ปริมาตร 1.0 µl, Sterile water 13.0 µl, Dilution buffer 3.0 µl, Big Dye Kit 2.0 µl และ 3.2 µM Primer (ตำแหน่ง DXS7130) 1.0 µl โดยจะใช้ Primer F ที่มีลำดับเบสดังนี้ Primer F : 5’- AGCCATTTGGAATATAGAGGAAGGG -3’

2.5.4) โปรแกรมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ได้แก่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 96 °C นาน 1 นาที 1รอบ จากนั้นเข้าสู่รอบของ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ คือ denature ที่อุณหภูมิ 96 °C นาน 10 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 5 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 4 นาที ทั้งหมด 25 รอบ

2.5.5) นำ PCR product ที่ได้มาตกตะกอนด้วย 100% Ethanol (ภาคผนวก ก)

2.5.6) นำ PCR product ที่ตกตะกอนเสร็จแล้วมาทำ denature DNA ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 2 นาที

2.5.7) Load PCR product ปริมาณ 16 µl ลงใน well PCR จากนั้น load เข้าเครื่องทำ DNA sequencing เพื่อหาจำนวนชุดเบสซ้ำ (Tandem repeat) สำหรับการกำหนดชนิดของอัลลีลตามมาตรฐานสากล

2.6 หาลำดับเบสของแต่ละอัลลีล โดยใช้ Primer R ในการทำปฏิกิริยาหาลำดับเบส (Sequencing reaction) เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น โดยทำตามขั้นตอนที่ 2.5 Primer R มีลำดับเบสดังนี้

Primer R : 5’- AGGACTGGGAAAGAACAAAGCAAGG -3’

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การหาความถี่ของอัลลีลและการประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอ ตำแหน่ง DXS7130 ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

3.1 ใช้น้ำสกัดดีเอ็นเอที่เหลือของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามขั้นตอนที่ 2.2 จากนั้นนำมาตรวจผล PCR ด้วยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis [วิฑูรย์และธานินทร์, 2005] เปรียบเทียบกับอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladder) ในตำแหน่ง DXS7130 ที่สร้างไว้

3.2 นับจำนวนแถบดีเอ็นเอจากลักษณะพันธุกรรม (Genotype) ที่พบในตัวอย่าง ในกรณีที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่สัมฤทธิผลหรือลักษณะของแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน จะทำซ้ำอีกไม่เกิน 3 ครั้ง หากยังไม่ได้ผลจะตัดตัวอย่างดังกล่าวออก

3.3 วิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณค่ากำลังการแยกแยะ (Power of discrimination: PD) และค่ากำลังการคัดออก (Power of exclusion: PE) ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS7130 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้ตรวจและประเมินประสิทธิภาพของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่ง DXS7130 เพื่อนำมาใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved