บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. microcentrifuge tube ขนาด 0.2 , 0.5 และ 1.5 ml
2. ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ
3. ปิเปต
4. ถุงมือ
5. 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. เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycler)
18. เครื่องตรวจหาลำดับเบส
19. Water bath / Heat block
20. กระดาษปอนด์
21. นาฬิกาจับเวลา
22. เครื่องชั่ง

สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. Proteinase K
4. dNTPs
5. 10X Taq buffer
6. Tris buffer pH 8.5
7. 2.5 µM Primer mix (DXS7132)
8. Taq DNA polymerase
9. Acrylamide
10. 10X Gel buffer
11. Ammoniumpersulfate
12. Glycerol
13. 20 bp ladder
14. 65% Nitric acid
15. Tetramethylethylenediamine (TEMED)
16. Silver nitrate
17. Sodium carbonate
18. 37% Formaldehyde
19. 100% glacial acetic acid
20. Ammonium acetate
21. 1X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer
22. 70% Ethanol
23. 50% Isopropanol
24. Sulfuric acid
25. 100% Ethanol
26. Agarose power
27. 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer
28. Sodium acetate

29. Ethidium bromide
30. Big Dye Kit
31. Hidi (formamide)
32. Dilution Buffer
33. 3.2 µM Primer (DXS7132)
34. Boric acid
35. 95% Ethanol
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 (โดยตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาคือ อัลลีล)

Z =1.96 (ความเชื่อมั่น 95%)

p = 0.328 (ความน่าจะเป็นของอัลลีลสูงสุดในตำแหน่ง DXS7132 (Shin *et al.*, 2005))

q = (1 – p) = 0.672

E = 0.05 (ให้ความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 5 %)

แทนค่าในสูตรได้

$$n = \frac{(1.96)^2x(0.328)x(0.672)}{(0.05)^2}$$

$$n = 338.70 \sim 339 \text{ อัลลีล}$$

ดังนั้นขนาดกลุ่มตัวอย่าง ที่ต้องใช้ในงานวิจัย ควรจะไม่น้อยกว่า 339 อัลลีล หรือไม่น้อยกว่า 170 คน (1 คนมี 2 อัลลีล)

เนื่องจากมีการศึกษาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 423 คน (Bhoopat *et al.*, 2006) และศึกษาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 110 คน (Bhoopat *et al.*, 1997) เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบความเหมือนกันของสัดส่วนประชากร (Test of homogeneity) ดังนี้ (มานัส, 2549)

ตาราง 1 แสดงจำนวนอัลลีลที่ได้จากการสังเกตในการศึกษาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยของทั้งสองกลุ่ม

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

ขั้นตอนและวิธีทดสอบ

1. สมมติฐาน

H_0 : สัดส่วนประชากรในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน

H_1 : สัดส่วนประชากรในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยทั้งสองกลุ่มแตกต่างกัน

2. คำนวณค่าสถิติที่ใช้ในการทดสอบคือ

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

โดยคำนวณค่าความถี่คาดหวังจาก

$$E_{ij} = \frac{RxC}{N}$$

ตารางแสดงจำนวนอัลลีลคาดหวัง (E_{ij}) ที่คำนวณได้

ตาราง 2 แสดงจำนวนอัลลีลคาดหวัง (E_{ij}) ในการศึกษาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยของทั้งสองกลุ่ม

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

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

$$\chi^2 = (93 - 94.44)^2 / 94.44 + \ldots + (1 - 1.03)^2 / 1.03$$

$$\chi^2 = 0.0220 + \ldots + 0.0009$$

$$\chi^2 = 1.7292$$

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 นั่นคือ สัดส่วนประชากรในดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง THO1 ในกลุ่มประชากรภาคเหนือของประเทศไทยทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้กลุ่มตัวอย่างจำนวน 120 คน เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาในการทำการทดลอง

1.2 การเก็บตัวอย่าง

1.2.1 กลุ่มตัวอย่าง

- กลุ่มตัวอย่างในการทดลองคือ ประชากรเพศหญิงที่ไม่ความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดและเป็นประชากรทางภาคเหนือของประเทศไทย (ขอบเขตของประชากรภาคเหนือในการศึกษาคือ ผู้ที่มีบิดาและมารดาเป็นคนภาคเหนือทั้ง 17 จังหวัด) โดยพิจารณาจากการสอบถามข้อมูลก่อนการเก็บตัวอย่าง

1.2.2 วิธีเก็บตัวอย่าง

- เก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell) จากกลุ่มตัวอย่าง โดยการใช้ไม้จิ้มฟันเช็ดเบาบริเวณกระพุ้งแก้มภายในปากของกลุ่มตัวอย่าง
- นำไม้จิ้มฟันที่เช็ดภายในปากของกลุ่มตัวอย่างแช่ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

2. การสร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเยื่อบุกระพุ้งแก้ม (SOP DNA ANALYSIS, 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) เติม chelex resin ให้ท่วมตะกอนและเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 200 µl แล้วเติม 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 (SOP DNA ANALYSIS, 2005)

2.2.1) PCR mixture ปริมาตรรวม 15 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดไว้ข้างต้น ปริมาตร 2.0 µl, Sterile water 7.0 µl, 1mM dNTPs 1.5 µl, 10X taq buffer 1.5 µl, 0.25 u/ml Taq DNA polymerase 1.5 µl และ 2.5 µM Primer mix (ตำแหน่ง DXS7132) 1.5 µl โดย Primer mix มีลำดับเบสดังนี้

Primer F : 5'-TATACTGTGGAACTTCTTAGCCTCC-3'

Primer R : 5'-TGGTGCCAAACTCTATTAGTCAACG-3'

โดยอ้างอิงมาจาก GenBank (ภาคผนวก จ)

2.2.2) 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 35 รอบ

2.3 ตรวจสอบผล PCR ที่ได้ด้วยการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis (SOP DNA ANALYSIS, 2005) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (20 bp ladder) จากนั้นนำมาย้อมสีเจลด้วย silver staining (ภาคผนวก ก) เพื่อให้เห็นแถบ DNA ชัดเจน

2.4 สร้างอัลลีลมาตรฐาน

2.4.1) ตัดแถบดีเอ็นเอที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วทีละแถบ โดยจะเลือกแถบที่เคลื่อนที่ไปหยุดในตำแหน่งต่างกันเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.4.2) สกัดแถบดีเอ็นเอ

- นำแถบ ดีเอ็นเอ ที่ตัด ออกมาแล้วบดให้ละเอียดด้วย 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
- เติม chelex resin ให้ท่วมตะกอนและเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 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

2.4.3) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามขั้นตอนที่ 2.2 จากนั้นนำมาตรวจผล PCR ด้วยการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis (SOP DNA ANALYSIS, 2005)

2.5 หาลำดับเบสของแต่ละอัลลีลในตำแหน่ง DXS7132 ด้วยเครื่องอัตโนมัติ

2.5.1) นำตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามขั้นตอนที่ 2.4.3 มาตกตะกอนด้วย Isopropanol (ภาคผนวก ก)

2.5.2) แบ่งตัวอย่างแถบ ดีเอ็นเอ ที่ตกตะกอนเสร็จแล้วประมาณ 5 µl มาเข้ากระบวนการ agarose electrophoresis (ภาคผนวก ก) เพื่อดูความเข้มของแถบดีเอ็นเอ

2.5.3) นำตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่เหลือจากขั้นตอนที่ 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 DXS7132) 1.0 µl โดยจะใช้ Primer F ที่มีลำดับเบสดังนี้

Primer F : 5’-TATACTGTGGAACTTCTTAGCCTCC-3’

2.5.4) โปรแกรมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ได้แก่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 96 °C นาน 1 นาที 1รอบ จากนั้นเข้าสู่รอบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ คือ denature ที่อุณหภูมิ 96 °C นาน 10 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 5 วินาที และextension 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

3. การหาความถี่ของอัลลีลและการประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอ ตำแหน่ง DXS7132 ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

3.1 ใช้น้ำสกัดดีเอ็นเอที่เหลือของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามขั้นตอนที่ 2.2 จากนั้นนำมาตรวจผล PCR ด้วยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis (SOP DNA ANALYSIS, 2005) เปรียบเทียบกับอัลลีลมาตรฐานในตำแหน่ง DXS7132 ที่สร้างไว้

3.2 นับจำนวนแถบดีเอ็นเอจากลักษณะพันธุกรรม (Genotype) ที่พบ ในกลุ่มตัวอย่างและหาความถี่ของอัลลีล ในกรณีที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่สัมฤทธิผลหรือลักษณะของแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน จะทำซ้ำไม่เกิน 2 ครั้ง หากยังไม่ได้ผลจะตัดตัวอย่างดังกล่าวออก

3.3 วิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณค่ากำลังการแยกแยะ และค่ากำลังการคัดออกของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS7132 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้ตรวจและประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ในตำแหน่ง DXS7132