บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สถานที่ทำการวิจัย

1. สวนดอกอณูพันธุศาสตร์ แผนกพยาธิวิทยาคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. Microcentrifuge tube ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 ml ยี่ห้อ Genuine Axygen
2. ไม้จิ้มฟันปลายทู่ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
3. Pipette ขนาด 2.5, 10, 20, 100, 200, 1000 และ 5000 µl ยี่ห้อ BIOHIT Mechanical Pipettors
4. ถุงมือพลาสติก
5. Beaker ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000ml
6. กระบอกตวง (Cylender)
7. Forcep
8. เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Pioneer™
9. Electrophoresis set ยี่ห้อ BIO-RAD
10. Hot plate stirrer ยี่ห้อ Digital™ Stirring Hot Plate
11. เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ Funny Shaker Major Science
12. ถาดพลาสติกสำหรับการย้อมเจล
13. เครื่องอบแห้งเจล (Gel dryer) ยี่ห้อ Thermo Electron Corporation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

14. เครื่องเขย่าวน (Vortex) ยี่ห้อ Labnet VX100
15. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Centronix Microcentrifuge 1236V
16. pH Meter
17. เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการทำ PCR ยี่ห้อ LONG GENE® Mygene™ Series Peltier Thermal Cycler Model MG96+
18. เครื่องตรวจหาลำดับเบส (Sequencing automated)
19. Water bath / Heat block ยี่ห้อ AccuBlock™ Digital Dry Bath
20. กระดาษปอนด์
21. นาฬิกาจับเวลา
22. ตู้แช่แข็ง (-20ºC) ยี่ห้อ SHARP
23. ตู้เย็น ยี่ห้อ SamSung
24. Tip ขนาด 0.2, 0.5, 1.0 และ 5.0 µl

สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. Proteinase K
4. dNTPs
5. 10X Taq buffer
6. N, N' Methylenebisacrylamide
7. 5 µM Primer mix (DXS101)
8. Taq DNA polymerase
9. Acrylamide
10. 10X Gel buffer
11. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
12. 87% Glycerol
13. 100 bp ladder
14. 65% Nitric acid
15. Tetramethylethylenediamine (TEMED)
16. Silver nitrate
17. Sodium carbonate
18. 37% Formaldehyde
19. 100% Glacial acetic acid
20. Acetic acid
21. 1X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer
22. 70% Ethanol
23. Boric acid
24. Sulfuric acid
25. Ethidium bromide
26. Agarose power
27. 0.5 M Sodium acetate
28. Bromophenol blue sodium salt
29. 100% Ethanol
30. 50% Isopropanol
31. Hidi (Formamide)
32. Dilution buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

33. 3.2 µM Forward primer (DXS101) 34. Big Dye Kit

35. 95% Ethanol 36. 4 M Ammonium acetate

37. 10 mM Tris (Hydroxymethyl Methylamine) pH 8. 5

วิธีการทดลอง

1. ขอบเขตประชากร ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

1.1 ขอบเขตประชากร

กลุ่มประชากรเพศหญิงที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดและเป็นประชากรที่อาศัยอยู่ทางภาคเหนือของประเทศไทยและเป็นผู้ที่มีบิดาและมารดามีภูมิลำเนาอยู่ในภาคเหนือทั้ง 17 จังหวัด โดยพิจารณาจากการสัมภาษณ์ข้อมูลก่อนการเก็บตัวอย่าง

1.2 การกำหนดขนาดตัวอย่าง

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

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

เมื่อ Z = 1.96 (ความเชื่อมั่นที่ 95%)

p = 0.2320 (ความน่าจะเป็นของอัลลีลสูงสุดในตำแหน่ง DXS101) (Yu *et al*., 2005)

q = 0.768 (1-p)

E = 0.05 (ให้ความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 5%)

แทนค่าในสูตรได้ $n = \frac{(1.96)^2 \times (0.2320) \times (0.768)}{(0.05)^2}$

n = 273.79 ~274 อัลลีล

ดังนั้น ขนาดกลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษาหาค่าความถี่ของดีเอ็นเอไมโครแซทเทไลท์ตำแหน่ง DXS101 ที่ต้องใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ควรจะมีไม่น้อยกว่า 274 อัลลีล หรือไม่น้อยกว่า 137 คน (1 คน มี 2 อัลลีล)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การเก็บตัวอย่าง

1.3.1 วิธีเก็บตัวอย่าง

ใช้ไม้จิ้มฟันปลายทู่ขูดด้านในผนังกระพุ้งแก้ม จำนวน 10 ครั้ง เพื่อทำการเก็บตัวอย่างจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cells) แล้วนำเอาไม้จิ้มฟันปลายทู่ที่เก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มจากกลุ่มตัวอย่างใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml

2. การสร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005)

2.1.1 นำไม้จิ้มฟันที่สวอบเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มจากกลุ่มตัวอย่างใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml

2.1.2 ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะได้ตะกอนสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ดูดน้ำชั้นบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน

2.1.3 ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้งดูดซับน้ำชั้นบนทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด

2.1.4 เติมเม็ด Chelex resin ลงไปพอท่วมตะกอนแล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 200 µl แล้วเติม Proteinase K (10 mg/ml) 2 µl ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ

2.1.5 แช่อบที่อุณหภูมิ 37ºC นานประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปเขย่าวน (Vortex) ประมาณ 5-10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที แล้วนำหลอดทดลองไปต้มน้ำเดือดนาน 8 วินาที

2.1.6 นำไปเขย่าวน (Vortex) อีก 10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8ºC หรือแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ให้ดำเนินตามขั้นที่ 2.1.5 และ 2.1.6 ตามต้องการ

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005)

2.2.1 PCR mixture ปริมาตรรวม 15 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่สกัดไว้ข้างต้นปริมาตร 1.5 µl, Sterile water 7.5 µl, 100 µM dNTPs 1.5 µl, 10X Taq buffer 1.5 µl, 0.375 U/µl Taq DNA polymerase 1.5 µl และ 5 µM Primer mix (ตำแหน่ง DXS101) 1.5 µl โดย Primer mix มีลำดับเบสดังนี้

Primer F: 5'-ACTCTAAATCAGTCCAAATATCT-3'

Primer R: 5'-AAATCACTCCATGGCACATGTAT-3'

โดยลำดับของ Primer อ้างอิงมาจาก Edelmann *et al*., 2001

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 โปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ได้แก่ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95ºC นาน 3 นาที 1 รอบ จากนั้นเข้าสู่รอบของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิคือ Denature อุณหภูมิ 94ºC นาน 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 62ºC นาน 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72ºC นาน 1.30 นาที ทั้งหมด 35 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72ºC นาน 3 นาที

2.3 ตรวจสอบผล PCR product ที่ได้ด้วยการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp ladder) จากนั้นนำมาย้อมสีด้วยวิธี Gel silver staining (Budowle *et al*., 1991) เพื่อให้เห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

2.4 สร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladder)

2.4.1 ตัดแถบ DNA ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วทีละแถบ โดยจะเลือกแถบที่เคลื่อนที่ไปหยุดในตำแหน่งที่ต่างกันเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (100 bp ladder)

2.4.2 สกัดแถบ DNA

- นำแถบของดีเอ็นเอที่ตัดออกมาบดให้ละเอียดโดยใช้ Forcep ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml
- ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะได้ตะกอนที่อยู่ก้นหลอด ดูดน้ำชั้นบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน
- ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้ง ดูดน้ำชั้นบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนที่อยู่ก้นหลอด
- เติมเม็ด Chelex resin ให้ท่วมตะกอนประมาณ 200 µl แล้วเติม Proteinase K (10 mg/ml) 2 µl ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ
- แช่อบที่อุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 1 ชั่วโมงนำไปเขย่าวน (Vortex) ประมาณ 5-10 วินาทีปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 วินาทีแล้วนำหลอดทดลองไปต้มเดือดนาน 8 นาที
- นำไปเขย่าวน (Vortex) อีก 10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8°C หรือแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ให้เขย่าวนอีก 10 นาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที

2.4.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามขั้นตอน 2.2 จากนั้นนำมาตรวจผล PCR ด้วยการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 หาลำดับเบสของแต่ละอัลลีลในตำแหน่ง DXS101 ด้วยเครื่องอัตโนมัติ

2.5.1 นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้น้ำสกัดแถบดีเอ็นเอเป็นแม่แบบ ตามขั้นตอน 2.4.3 มาตกตะกอนด้วยวิธี Isopropanol precipitation (ภาคผนวก ก)

2.5.2 นำ PCR product ที่ตกตะกอนเสร็จแล้วประมาณ 5 µl มาตรวจสอบโดยกระบวนการ Agarose electrophoresis (ภาคผนวก ก) เพื่อดูความเข้มข้นของแถบ DNA

2.5.3 นำ PCR product ที่เหลือจากขั้นตอน 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 DXS101) 1.0 µl โดยจะใช้ Primer F ที่มีลำดับเบส ดังนี้

Primer F: 5'-ACTCTAAATCAGTCCAAATATCT-3'

2.5.4 โปรแกรมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ได้แก่ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 96ºC นาน 1 นาที 1 รอบ จากนั้นเข้าสู่รอบของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิคือ Denature อุณหภูมิ 96ºC นาน 10 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50ºC นาน 5 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 60ºC นาน 4 นาที ทั้งหมด 25 รอบ

2.5.5 นำ product ที่ได้มาตกตะกอนด้วย 100% Ethanol (ภาคผนวก ก)

2.5.6 นำ product ที่ตกตะกอนเสร็จแล้วมาทำ Denature DNA ที่อุณหภูมิ 95ºC นาน 2 นาที

2.5.7 Load product ปริมาณ 16 µl ลงใน well PCR จากนั้น load เข้าเครื่องทำ Capillary electrophoresis เพื่อหาจำนวนชุดเบสซ้ำ (Tandem Repeat) สำหรับการกำหนดชนิดของอัลลีลตามมาตรฐานสากล

3. การหาความถี่ของอัลลีลและการประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่ง DXS101 ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

3.1 ใช้น้ำสกัดดีเอ็นเอที่เหลือของกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามขั้นตอนที่ 2.2 จากนั้นนำมาตรวจสอบ PCR product ด้วยการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005) เปรียบเทียบกับอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladder) ในตำแหน่ง DXS101 ที่สร้างไว้

3.2 นับจำนวนแถบดีเอ็นเอจากลักษณะพันธุกรรม (Genotype) ที่พบอัลลีลต่าง ๆ เพื่อหาความถี่ของอัลลีล ในกรณีที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่สัมฤทธิ์ผล หรือลักษณะของแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน จะทำซ้ำอีกประมาณ 2-3 ครั้ง หากยังไม่ได้ผลจะตัดตัวอย่างดังกล่าวออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วิเคราะห์ข้อมูลของค่าความถี่ในแต่ละอัลลีล และคำนวณค่ากำลังการแยกแยะ (Power of Discrimination: PD), ค่ากำลังการคัดออก (Power of Exclusion: PE), ค่า Heterozygosity (h) และ Hardy-Weinberg Equilibrium ของลักษณะรูปแบบของดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศหญิงในตำแหน่ง DXS101 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีการหรือเทคนิคที่ใช้ตรวจ และการเลือกสุ่มตัวอย่างที่เป็นไปอย่างถูกต้องและเหมาะสม และประเมินประสิทธิภาพของตำแหน่ง DXS101 ในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

4. ทำการทดสอบความเป็นอิสระต่อกัน (Linkage equilibrium)

ทำการทดสอบความเป็นอิสระต่อกันระหว่างตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7130 และตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7132 โดยการใช้สถิติ Chi-square test (X^2) ในการคำนวณเพื่อเปรียบเทียบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7130 และตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7132 ว่ามีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมอย่างเป็นอิสระต่อกันหรือไม่

4.1 วิเคราะห์ลักษณะของ Genotype ที่ได้จาก DNA sample เดียวกันของตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7130 ทำการเปรียบเทียบเป็นทีละ Sample จนครบจำนวน 83 ตัวอย่าง

4.2 นับจำนวน Genotype ที่มีโอกาสเป็นไปได้ทั้งหมด โดยเปรียบเทียบระหว่างตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7130 เช่น ตัวอย่างดีเอ็นเอหมายเลข 1 ในตำแหน่ง DXS101 มี Genotype เป็น 21/21 ส่วนตำแหน่ง DXS7130 มี Genotype เป็น 15.3/16.3 Genotype ที่มีโอกาสเป็นไปได้ทั้งหมด 4 Haplotype คือ 21/15.3, 21/16.3, 21/15.3 และ 21/16.3 ทำแบบนี้จนครบทั้ง 83 ตัวอย่าง

4.3 หาความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลในตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7130 โดยการนับจำนวน Haplotype ที่มีโอกาสเป็นไปได้ทั้งหมด

4.4 ใช้ Chi-square test (X^2) ในการคำนวณ เพื่อทดสอบความเป็นอิสระต่อกันระหว่างตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7130

4.5 การทดสอบความเป็นอิสระต่อกันระหว่างตำแหน่ง DXS101 กับตำแหน่ง DXS7132 ก็ทำเช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved