บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ศูนย์สวนดอกอณูพันธุศาสตร์ แผนกพยาธิวิทยาคลีนิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. Microcentrifuge Tube ขนาด 0.5 และ1.5 ml
2. ปิเปต
3. ถุงมือ
4. Forcep
5. บีกเกอร์ (Beaker)
6. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
8. เครื่องชั่งสาร
9. Hot Plate Stirrer
10. Heating Block Incubator
11. Thermal Cycler
12. Electrophoresis Set
13. Ultraviolet-visible Transilluminator
14. Gel Documentation
15. นาฬิกาจับเวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. Proteinase K
4. dNTPs
5. 10X Taq buffer
6. Taq DNA polymerase
7. 5.0 µM Primer Mix (Cyt b Sus Scrofa)
8. Tris
9. 100 bp Ladder
10. 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer
11. Agarose Powder
12. Ethidium Bromide
13. Boric Acid
14. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

1.1 กำหนดขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาที่เกี่ยวกับการประมาณค่าสัดส่วนประชากร ดังนั้น จึงกำหนดขนาดตัวอย่างด้วยวิธีการประมาณค่าสัดส่วนของประชากรโดยยอมให้เกิดค่าความคลาดเคลื่อน e% ในกรณีที่ไม่ทราบค่า P ซึ่งมีสูตรการหาขนาดตัวอย่าง ดังนี้

$$n = \frac{z^2}{4e^2} \quad (4)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยที่ n คือ จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ

z คือ 1.65 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 90%) และ

e คือ 0.1 ความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้นในรูปของสัดส่วน (ระดับนัยสำคัญ 10%)

แทนค่าในสูตรได้ $\mathbf{n = \frac{(1.65)^2}{4(0.1)^2}}$

$$\mathbf{n = 68.0625}$$

ดังนั้น ขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่เหมาะสมที่ต้องใช้ในการวิจัยครั้งนี้ต้องไม่น้อยกว่า 68.0625 เพื่อความเหมาะสมจึงใช้ 70 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับมนุษย์และสัตว์อื่น ได้แก่ ไก่ ปลา และวัว อีก ชนิดละ 18 ตัวอย่าง

1.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจากร้านค้าเนื้อสุกรในตลาดสดทั้งในตัวอำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่และอำเภอใกล้เคียง รวมถึงจังหวัดลำพูน โดยเก็บตัวอย่างเนื้อสุกร 1 ตัวอย่างต่อ 1 ร้านค้า จำนวน 70 ร้าน โดยชิ้นเนื้อแต่ละตัวอย่างแยกบรรจุในถุงพลาสติกใส แล้วแช่แข็งระหว่างการเดินทาง เพื่อนำมาสกัดในขั้นตอนต่อไป

2. การตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วย Chelex [3]

โดยอาศัยคุณสมบัติของเม็ด Chelating Resin, Chelex-100 ที่เป็นด่าง (pH 10-11) และไม่ละลายน้ำซึ่งมีชื่อจริงคือ imminodiacetic acid มีคุณสมบัติในการจับได้กับโลหะหมู่ 2+ อย่างเช่น Ca2+, Mg2+ และอื่นๆที่มีประจุ 2+ อีกมากมาย ดังนี้จึงสามารถสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ต่าง ๆ ได้โดยไม่ยุ่งยากและประหยัดเวลา เนื่องจากความเป็นด่างของ Chelex-100 และการต้มที่อุณหภูมิ 100 °C จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกสลาย พร้อมทั้งทำให้ดีเอ็นเอแปรสภาพ โดยมีขั้นตอนการสกัดดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด [5]

- เจาะเลือดปริมาณ 1 มล. ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA อยู่ผสมให้เข้ากัน

- ปิเปตตัวอย่างเลือด 30 ไมโครลิตรใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 1 มล. เขย่าวน (Vortex) ประมาณ 10-15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-30 นาที

- ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที

- ดูดเอาน้ำชั้นบนออกมากที่สุดจะเห็นตะกอนรวมเม็ดเลือดขาวตกอยู่ที่ก้นหลอด (ตะกอนอาจมีสีแดงปนเนื่องจากการตกตะกอนของฮีโมโกบิน) เติมน้ำกลั่น 1 มล. เขย่าวนนาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก ปั่นล้างทั้งหมด 3 รอบ

- เติมสารแขวนลอย Chelex 5% ลงไปประมาณ 200 ไมโครลิตร สังเกตให้เม็ด Chelex ท่วมตะกอนเม็ดเลือดขาวที่ก้นหลอดหรือไม่ หากยังไม่ท่วมให้เติมเฉพาะเม็ด Chelex ลงไปจนท่วมตะกอน

- แช่อบที่อุณหภูมิ 56 ºC นานประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนตะกอนถูกย่อยจนหมด จากนั้นนำมาเขย่าวน (Vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก

- นำหลอดทดลองไปต้มที่น้ำเดือดนาน 8 นาที

- นำไปเขย่าวน (Vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก

- จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับกระบวนการ PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นขน [5]

- ตรวจเส้นขนด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูว่ามีเยื่อหุ้มรากขน (Root sheath) หรือไม่

- ล้างเส้นขนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water) ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล.

- ตัดเอาโคนขนประมาณ 1 มม. จากปลายรากเป็นตัวอย่างที่ใช้สกัด

- ใส่โคนเส้นขนลงในหลอดทดลอง เติมน้ำแขวนลอย Chelex 5% ลงไป 200 ไมโครลิตร แล้วเติม 2 ไมโครลิตรของ Proteinase K (10 มก. /มล.) ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอดเบาๆ

- ตรวจดูให้แน่ใจว่าโคนเส้นขนนั้นจมอยู่ใต้เม็ด Chelex แล้วแช่อบหลอดทดลองที่ 37 ºC นานประมาณ 30-60 นาที จากนั้นเขย่าวน (Vortex) ประมาณ 5-10 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที 10 วินาที (Spindown)

- นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นำไปเขย่าวน (Vortex) ประมาณ 5-10 วินาที ปั่นแยก (Spindown) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับขบวนการ PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อ [5]

- นำชิ้นเนื้อที่ได้ประมาณ 0.5 ลบ.ซม. มาตัดให้มีขนาดเล็กมากที่สุด
- นำชิ้นเนื้อที่ละเอียดแล้วประมาณ 1 หัวไม้ขีดมาใส่ลงใน micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นลงไป 1 มล.
- เขย่าวน (vortex) นานประมาณ 5 นาทีและนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วดูดน้ำชั้นบนทิ้ง
- ทำซ้ำข้อ 3 อีก 3 ครั้ง แล้วจึงดูดน้ำชั้นบนทิ้ง โดยเหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด
- เติมเม็ด chelex ลงไปให้โดยให้ท่วมชิ้นเนื้อ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม proteinase K ลงไป 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ
- แช่อบที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 60 นาที
- นำไปเขย่าวน (vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที (spindown)
- นำหลอดทดลองไปต้มที่น้ำเดือดนาน 8 นาที
- นำไปเขย่าวน (vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่ตนาที นาน 10 วินาที (spindown)
- จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับขบวนการ PCR

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) [5]

PCR mixture ปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย

Sterile water	5 µl
10X Taq Buffer	1 µl
dNTPs (1 mM each)	1 µl
0.25 U/µl Taq DNA polymerase	1 µl
5 µM Primer Mix (Sus scrofa cyt b)	1 µl
ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)	1 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดย Primer mix มีลำดับเบสดังนี้

Cytochrome b Sus Scrofa

Primer Forward: 5’ –AAT CTT GCA AAT CCT AAC AGG CC- 3’

Primer Reverse: 5’ –CCG TTT GCA TGT AGA TAG CGA AT- 3’

โปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่

Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ºC นาน 4 นาที 1 รอบ จากนั้น

- Denature ที่อุณหภูมิ 94 ºC นาน 30 วินาที
- Annealing ที่อุณหภูมิ 69 ºC นาน 30 วินาที
- Extension ที่อุณหภูมิ 72 ºC นาน 1 นาที ทั้งหมด 32 รอบ

2.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยการทำ Agarose gel electrophoresis [5]

ขั้นตอนการทำ Agarose Gel Electrophoresis

1.เตรียม 2% Agarose Gel โดยมีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่ง Agarose Powder 0.8 g
- ต้มใน 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer ที่ 60 °C จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันแต่มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ml
- เทใส่แม่พิมพ์ เสียบหวีไว้เพื่อให้เกิดหลุมแล้วทิ้งไว้ให้เจลแห้ง

2.เตรียมเครื่อง Agarose Electrophoresis เปิดและปรับการทำงานที่ 100V นาน 20 นาที

3.วางถาดเจลที่เตรียมไว้ลงในเครื่องแล้วเติม 0.5X TBE Buffer ให้ท่วมเจลพอดี

4.เติม loading dyes 1 µl ลงใน PCR product และเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

5.โหลด ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder 5 µl, Positive Control, Negative Control และ PCR product อย่างละ 5 µl ลงในหลุมเจล

6.เมื่อครบเวลาจึงแช่เจลด้วยสารละลาย Ethidium Bromide นาน 30 นาที

7.นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Ultraviolet Visible Transilluminator เพื่อตรวจสอบผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การประเมินค่าความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจงของวิธีการที่ใช้ระบุสารพันธุกรรมของสุกร

3.1 ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของมนุษย์และปลา เนื้อไก่ และเส้นขนวัว ชนิดละ 18 ตัวอย่าง [5]

3.2 นำน้ำสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อที่ 3.1 มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCRจากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis

3.3 วิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณค่าความถูกต้อง เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของวิธีการที่ใช้ระบุสารพันธุกรรมของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved