บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ และอุปกรณ์ในการทดลอง

1. Microcentrifuge tube 0.2, 0.5 และ 1.5 ml
2. ใบมีดผ่าตัด
3. Pipette
4. ถุงมือ
5. Beaker
6. กระบอกตวง
7. Forceps
8. เครื่องชั่งสาร
9. Acrylamide electrophoresis set
10. Hot plate stirrer
11. เครื่องเขย่า (Shaker)
12. Incubator
13. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
14. เครื่องบด
15. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
16. ชุดหลอดบด
17. นาฬิกาจับเวลา
18. เครื่อง Gel dryer

2. สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Acrylamide
3. dNTPs
4. *Bst* DNA polymerase
5. 10X *Bst* Buffer
6. Tris
7. H_2SO_4
8. KCl
9. conc. Chloroform
10. LAMP primer set
11. Tris-HCl
12. $(NH_4)_2SO_4$
13. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder
14. Phenol
15. 0.1% triton X-100
16. DNA template
17. N,N'methylenebisacrylamide
18. Isopropanol
19. Ammonium Acetate
20. Betaine
21. 10X gel Buffer
22. 87% Glycerol
23. Tetramethylethylenediamine
24. Boric acid
25. ไนโตรเจนเหลว
26. 0.5M EDTA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

27. 70% Ethanol 28. 0.25M Phosphate

29. Bromophenol blue

3. วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บมี 3 ประเภทคือ

3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้เป็น positive control คือ รากฟันของเพศชายที่ไม่ได้นำไปเผา

3.1.2 ตัวอย่างที่ใช้เป็น negative control คือ รากฟันของเพศหญิงที่นำไปเผาด้วยเตาถ่าน และเตาแก๊ส

3.1.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ รากฟันของเพศชาย และเพศหญิงที่นำไปเผาด้วยเตาถ่าน และเตาแก๊ส

ตัวอย่างฟันกลุ่มหนึ่งถูกเผาในเตาถ่านเป็นระยะเวลา 30 นาที และตัวอย่างฟันอีกกลุ่มหนึ่งถูกเผาในเตาแก๊สเป็นระยะเวลา 30 นาที เช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 กำหนดขนาดตัวอย่าง

งานวิจัยนี้แบ่งตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (Two Independent Sample) และชนิดของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นข้อมูลแบบไม่ต่อเนื่อง (Discrete) ในส่วนของผลการทดลองนั้นเป็นสัดส่วนกันของชายกับหญิง ดังนั้นจึงกำหนดขนาดตัวอย่างด้วยวิธีการประมาณค่าสัดส่วนของประชากร ซึ่งมีสูตรการหาขนาดตัวอย่าง (n) ดังนี้

$$n = \frac{(Z_\alpha \sqrt{2P\bar{Q}} + Z_\beta \sqrt{P_c Q_c + P_t Q_t})^2}{(P_c - P_t)^2}$$

เมื่อ

Z_α = ค่า Z ที่ได้จากตารางแจกแจงปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนด Type I error เท่ากับ 1% ค่า Z_α จะเท่ากับ 2.576

Z_β = ค่า Z ที่ได้จากตารางแจกแจงปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนด Type II error เท่ากับ 1% ค่า Z_β จะเท่ากับ 2.326

จากงานวิจัยของ Nogami et al. ที่ทำการระบุเพศด้วยเทคนิคแลมป์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน ซึ่งในผลการวิจัยระบุว่า สามารถระบุเพศได้ 100% ดังนั้น ค่า P_c จึงเท่ากับ 0 และค่า P_t จึงเท่ากับ 1 และสัดส่วนชายหญิงเท่ากันนั่นคือ n_t=n_c ค่า Lambda จึงเท่ากับ 1

P_c = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มควบคุม นั่นก็คือสารพันธุกรรมของเพศหญิง = 0

P_t = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มศึกษา นั่นก็คือสารพันธุกรรมของเพศชาย = 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แทนค่าในสูตรได้ดังนี้

$Q_C = 1-P_c = 1$

$Q_t = 1-P_t = 0$

$$\bar{P} = \frac{P_c + \lambda P_t}{1+\lambda}$$ เมื่อ Lambda = n_t/n_c, $n_t=n_c$ Lambda = 1 คำนวณได้ 0.5

$$\bar{Q} = 1 - \bar{P} = 0.5$$

$$n = \frac{(2.576\sqrt{2(0.5)(0.5)} + 2.326\sqrt{(0)(1)+(1)(0)})^2}{(0-1)^2}$$

$n = 3.317 \geq 4$

ดังนั้นขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยไม่ควรน้อยกว่า 4 คน

งานวิจัยนี้วิเคราะห์การระบุเพศของมนุษย์ด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้สารพันธุกรรมจากกลุ่มตัวอย่างฟัน 20 คน เป็นชาย 10 คน หญิง 10 คน จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งมีตัวอย่างฟัน 10 ตัวอย่าง (เพศชาย 5 ตัวอย่าง และเพศหญิง 5 ตัวอย่าง) ถูกเผาด้วยเตาถ่าน และกลุ่มที่สองประกอบด้วยตัวอย่างฟัน 10 ตัวอย่าง (เพศชาย 5 ตัวอย่าง และเพศหญิง 5 ตัวอย่าง) ถูกเผาด้วยเตาแก๊ส ตัวอย่างที่ใช้เป็น Negative control คือ รากฟันของเพศหญิงที่นำไปเผาด้วยเตาถ่าน และเตาแก๊ส ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ รากฟันของเพศชาย และหญิงที่นำไปเผาด้วยถ่านและเตาแก๊ส Positive control คือ รากฟันเพศชายที่ไม่ถูกเผา แต่นำไปสกัดสารพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม สำหรับการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเทคนิค และการทดสอบในทางสถิติ ได้ตั้งสมมติฐานดังนี้

H_0 = เทคนิคแลมป์สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ไม่แตกต่างกัน

H_1 = เทคนิคแลมป์สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การเตรียมตัวอย่าง

3.3.1 ทำความสะอาดตัวอย่างรากฟันที่ถูกเผาแล้ว ด้วยใบมีดผ่าตัด โดยขูดเอาขี้เถ้า และสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ออกให้มากที่สุด

3.3.2 นำรากฟันที่ขัดแล้วมาล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณสามครั้งให้ตัวอย่างรากฟันสะอาดที่สุด จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3 บดฟันโดยใช้ไนโตรเจนเหลวกับเครื่องบดกระดูก Freezer/Mill , model 6750 ในขั้นตอนนี้มีหลอดที่ใช้สำหรับบดรากฟันตัวอย่าง เมื่อประกอบหลอดบดเสร็จแล้วทำการใส่ตัวอย่างรากฟันลงไปในหลอดบด แล้วปิดฝาหลอด ประกอบหลอดบดตัวอย่างเข้ากับตัวเครื่องบด หลังจากนั้นเติมไนโตรเจนเหลวลงไปในเครื่องเพื่อให้หลอด และตัวอย่างรากฟันปรับอุณหภูมิ โดยการเติมไนโตรเจนเหลวนั้นจะเติมสองครั้งก่อนบด จากนั้นเปิดสวิตช์ให้เครื่องบดทำงานตามโปรแกรมที่ตั้งไว้อยู่แล้ว จากนั้นนำหลอดออกมาจากเครื่องยังไม่ต้องเอาตัวอย่างออก เนื่องจากอุณหภูมิของหลอดต่ำมากทำให้ไม่สามารถเปิดได้ในทันที จึงต้องทิ้งไว้หนึ่งคืน

3.3.4 นำตัวอย่างรากฟันที่บดแล้วมาสกัดด้วยสารละลาย 0.5 M EDTA + 0.25 M Phosphate (ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.0) โดยในขั้นตอนการสกัดนี้จะให้ตัวอย่างรากฟันทำปฏิกิริยากับสารละลายโดยการผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.5 ปั่นแยกสารละลายออกจากผงรากฟันที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตส่วนของสารละลายชั้นบน (Supernate) มาใส่ในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml จากนั้นนำไปสกัดในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การสกัดสารพันธุกรรม

วิธี Phenol chloroform extraction

3.4.1 ปิเปต Supernate ใส่ในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml ปริมาณ 500 µl

3.4.2 เติมสารละลาย Phenol ลงไปในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml 500 µl

3.4.3 ผสมสารละลายโดยใช้เครื่องเขย่า(Vortex) จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง(Centrifuge) 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดชั้นบนของสารละลายทิ้ง ให้เหลือเฉพาะสารละลายใสด้านล่าง

3.4.4 เติม Chloroform เข้มข้นลงไป 500 µl จากนั้นผสมสารละลายโดยใช้เครื่องเขย่า (Vortex) จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นดูดชั้นที่คาดว่าจะมี DNA อยู่ซึ่งเป็นชั้นบนของสารละลายไปสกัดขั้นต่อไป

การตกตะกอน DNA โดยใช้ Isopropanol Precipitation

3.4.5 ปิเปต Supernate ใส่ในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml ปริมาณ 300 µl

3.4.6 เติมสารละลาย 4 M Ammonium acetate ลงไปในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml 300 µl

3.4.7 เติม Isopropanol 600 µl ลงไปในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml

3.4.8 ผสมสารละลายโดยใช้เครื่องเขย่า (Vortex) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดชั้นของสารละลายทิ้ง ให้เหลือเฉพาะตะกอนของ DNA ซึ่งมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า

3.4.9 เติม 70% Ethanol 300 µl ปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดชั้นของสารละลายทิ้ง ให้เหลือเฉพาะตะกอนของ DNA ซึ่งมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง

3.4.10 เติม 10 mM Tris pH 8.5 ปริมาณ 20 µl เพื่อละลาย DNA และนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 ไพร์เมอร์ที่ใช้

FIP: 5’-aatccgaatggtcaggcagg-ccagtttaagctctgatggtt-3’ (41mer)
BIP: 5’-gactctttcctcctaaatatggctg-tttgccctttcatggaac-3’ (44mer)
F3: 5’-ggtcccaattttacagttcc-3’ (20mer)
B3: 5’-ctggtcagtcagagttgac-3’ (19mer)

3.6 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

3.6.1 ในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดไว้ข้างต้น 2 ไมโครลิตร, 0.32 U/ µl *Bst* DNA polymerase, 1XBuffer, 0.8 M Betaine, Amelogenin Y Primer set (1.6 µM each FIP&BIP, 0.2 µM each F3&B3) และ 0.4 mM each dNTPs ปรับปริมาตรให้ได้ 25 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองเล็กขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยปริมาตรสารที่ใช้ในแต่ละตัว แสดงไว้ในตาราง 1

ตาราง 1 ปริมาณและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ต่อปฏิกิริยาของ LAMP

Chemical	**Final Concentrate**	**Stock**	**Volume/ 1 tube**
H_20	-	-	9 µl
10X Buffer	1X	10X	2.5 µl
Betaine	0.8 M	5M	4 µl
dNTPs	0.4 mM each	2.5 mM each	4 µl
Primer Mix	FIP&BIP 1.6 µM each	16 µM each	
	F3&B3 0.2 µM each	2 µM each	2.5 µl
Bst DNA polymerase	0.32 U/ µl	8 U/ µl	1 µl
Template	-	-	2 µl
Total	-	-	25 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.2 เมื่อปรับปริมาตรแล้ว นำมาแช่อบ (Incubation) ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

3.6.3 ทำการตรวจสอบโดยการทำ Acrylamide gel electrophoresis

3.7 การเตรียม 8.5% Acrylamide gel (ปริมาตร 37.015 ml/ 1 แผ่น)

- น้ำกลั่น	21.26	ml
- 10X Gel buffer	3.7	ml
- 34% Acrylamide solution	9.3	ml
- 87% Glycerol	2.55	ml
- 10% Ammoniumpersulfate	191.0	µl
- Tetramethylethylenediamine	14.0	µl

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ Stirrer plate นาน 1 นาที โดยสังเกตไม่ให้เกิดฟองอากาศจากนั้นเทลงในชุดกระจกสำหรับเตรียมเจลปักหวีสำหรับทำให้เกิดช่อง แล้วทิ้งเจลไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง

3.8 วิธีแยกแถบดีเอ็นเอ

- ผสม LAMP product ปริมาณ 5 µl กับ Loading dye 1 µl หยอดลงในหลุมของแผ่นเจล
- ใช้กระแสไฟฟ้า 85 volt นาน 16 ชั่วโมง 30 นาที
- ทำการย้อมเจลด้วยวิธี Silver Staining

3.9 การย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining

3.9.1 เติม 1% Nitric acid [2.8 ml 70% Nitric acid + น้ำกลั่น 200 ml] เขย่า 10 นาทีแล้วเททิ้ง

3.9.2 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5-10 วินาทีแล้วเททิ้ง 2 ครั้ง

3.9.3 เติม 0.012M Silver nitrate solution [0.4 g Silver nitrate + น้ำกลั่น 200 ml] เขย่า 35 นาทีแล้วเททิ้ง

3.9.4 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5-10 วินาทีแล้วเททิ้ง 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.9.5 เติม 0.28 M Sodium carbonate และ 0.019% formalin [11.8 g Sodium carbonate + น้ำกลั่น 390 ml แล้วเติม 37% formalin 205 µl] ลงไป 50 ml เมื่อสีของสารละลายเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลให้เททิ้ง และเติมส่วนที่เหลือลงไปเขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอบนเจลชัดเจน

3.9.6 หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% glacial acetic acid [20 ml 100% glacial acetic acid + น้ำกลั่น180 ml] เขย่า 5 นาที

3.9.7 ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 200 ml นาน 1 นาที 3 ครั้ง หรือจนหมดกลิ่น

3.9.8 ถ่ายรูป หรือนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Gel dryer

3.8 การตรวจสอบผลการตรวจระบุเพศ

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจล ดูผลเปรียบเทียบระหว่างเพศชายกับเพศหญิงว่าสามารถตรวจหาสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Amelogenin Y ได้แตกต่างกันหรือไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved