บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการบริเวณ ข่วงสิงห์ อ.เมือง จ. เชียงใหม่
2. ศูนย์สวนดอกอนุพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การคัดเลือกประชากรที่จะทำการศึกษา

$$n = \frac{(Z \propto \sqrt{2\overline{PQ}} + Z\beta\sqrt{PcQc + PtQt})^2}{(Pc - Pt)^2}$$

Z_α= ค่า Z ที่ได้จากตารางมาตรฐาน เมื่อกำหนดความเชื่อมั่น 95% = 1.96

Z_β= ค่า Z ที่ได้จากตารางมาตรฐาน เมื่อกำหนด power of the test 90% = 1.28

P_t = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มศึกษา = 0.58

P_c = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มควบคุม = 0

Q_c= 1- P_c= 1

Q_t= 1- P_t = 0.42

P = (P_c+ P_t)/2 =0.29

Q = 1-P =0.71

ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม = $\frac{(1.96\sqrt{2(0.29)(0.71)}+1.28\sqrt{(0)(1)+(0.58)(0.42)})^2}{(0-0.58)^2}$

= 10.6 ~ 11 คน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้นจะต้องใช้ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม กลุ่มละ 11 คนเป็นอย่างน้อย

ในการทดลองนี้ใช้กลุ่มตัวอย่างทดลอง 2 กลุ่มคือ กลุ่มศพที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำจำนวน 16 ศพ และกลุ่มศพที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่นจำนวน 16 ศพ

การเก็บตัวอย่างเลือด

ใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บจากหัวใจและการเก็บเลือดนั้นเก็บโดยเทคนิคปราศจากเชื้อ เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 ̊C จนกว่าจะนำมาทดสอบโดยไม่ทิ้งไว้เกิน 3 วัน

การสกัดสารพันธุกรรม

ประยุกต์ใช้วิธีของ Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวช ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005) มีขั้นตอนดังนี้

1. ปั่นแยกเลือด ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงและเศษเซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอด
2. ดูดแยกน้ำเหลืองที่อยู่ด้านบนออกใส่หลอดใหม่จำนวน 500 µl ระวังอย่าให้มีเม็ดเลือดแดงหรือเศษเซลล์ติดมาด้วย
3. นำส่วนน้ำเหลืองที่แยกออกมาปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้แบคทีเรียที่มีอยู่ตกลงสู่ก้อนหลอด ในกรณีที่เห็นตะกอนสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ให้ดูดน้ำเหลืองส่วนบนทิ้ง หากไม่สามารถมองเห็นตะกอนที่ก้อนหลอดได้ ให้ดูดน้ำเหลืองส่วนบนออก เหลือส่วนล่างไว้เล็กน้อย
4. ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้ง ดูดน้ำชั้นบนทิ้ง ให้เหลือแต่ตะกอนจับที่ก้นหลอด
5. เติม proteinase K (10 mg/ml) ลงไป 2 µl เขย่าให้เข้ากัน
6. เติมเม็ด chelex ลงไปให้ท่วมตะกอน และเติม 10 mM Tris pH 8.5 จำนวน 200 µl เขย่าเบาๆให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. แช่อบที่อุณหภูมิ 55 ° C นาน 1 ชั่วโมง นำไปเขย่าวน 5-10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
8. แช่อบที่อุณหภูมิ 75 ° C นาน 1 ชั่วโมง
9. นำไปเขย่าวน 10 วินาทีปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
10. ใช้น้ำส่วนบนเป็นแม่แบบสำหรับขบวนการ LAMP ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 ° C หรือแช่แข็ง เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ ให้ดำเนินการตามขั้นตอนที่ 9 และ 10 ตามที่กล่าวมาแล้ว

ตัวควบคุมผลบวก (Positive control) และตัวควบคุมผลลบ (Negative control)

ตัวควบคุมผลบวก ได้จากการนำน้ำลายมาสกัดเชื้อ *Streptococcus salivarius* โดยใช้น้ำลายปริมาตร 1 ml สกัดตามวิธีการสกัดสารพันธุกรรมของแบคทีเรียในเลือด ตัวควบคุมผลลบ (mock control) ใช้น้ำเลือดของผู้ที่ไม่ได้เสียชีวิตจากการจมน้ำ และน้ำกลั่น

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

ประยุกต์ใช้วิธีของ Nakanishi (Nakanishi *et al*., 2011) โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อในส่วนของ glucosyltransferase K (*gtf*K) มีขั้นตอนดังนี้

ใช้ไพร์เมอร์ทั้งหมด 6 ตัวคือ

FIP	5’-CAGGTTTGGCTTCAACCTCTACGTTCAACCAAATTCAGGAAC- 3’
BIP	5’-GTTGCTACTAAACCAGAAACAGCACTTCTCAGTCGTTGGAG- 3’
F3	5’-GTTACTGCTGACAAACCAG- 3’
B3	5’-CCTTAATTTCGGCTTCAGAA- 3’
LF	5’-TGCTGCAGCTCTATCACTAG- 3’
LB	5’-AGAAGTCGCTGCAAATGCTG- 3’

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 แสดงความเข้มข้นของ Primer แต่ละตัวในปฏิกิริยา LAMP 25 µl ที่มีดังนี้

Primer	ความเข้มข้นสุดท้าย
FIP	1.6 µM
BIP	1.6 µM
F3	0.8 µM
B3	0.8 µM
LF	0.2 µM
LB	0.2 µM

ในปฏิกิริยาเกิดในส่วนผสมที่มีปริมาตร 25 µl ซึ่งประกอบไปด้วย

ตาราง 2 แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยา LAMP 25 µl

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้
น้ำ	9.0 µl
10X reaction buffer	2.5 µl
4M Betaine	4.0 µl
5mM each dNTPs	4.0 µl
Primer mix	2.5 µl
8U/µl *Bst* polymerase	1.0 µl
template	2.0 µl

การเตรียม Primer mix และ 5mM each dNTPs ดูได้จาก ภาคผนวก ก

LAMP condition มีดังนี้

- แช่อบที่อุณหภูมิ 63 ๐C 60 นาที
- หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 ๐C 2 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจสอบผลของสารพันธุกรรมที่ได้

ตรวจสอบว่ามี Lamp products โดยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) เมื่อผลเป็นบวกจะปรากฏแถบดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นขั้นบันได ส่วนผลลบจะไม่ปรากฏแถบที่มีลักษณะเป็นขั้นบันได

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ประยุกต์ใช้วิธีของ Suto (Suto *et al*., 2009) โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อในส่วนของ fructosyltransferase (ftf) gene and uracil phosphoribosyltransferase and ATP - dependent protease proteolytic subunit genes มีขั้นตอนดังนี้ ใช้ไพร์เมอร์

Forward primer 5’-CCAGCGGTACCAAAGGTAAA- 3’

Backward primer 5’-GCACTCATCCAATTGTCACG- 3’

ในปฏิกิริยาเกิดในส่วนผสมที่มีปริมาตร 10 µl ซึ่งประกอบไปด้วย

ตาราง 3 แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR 10 µl

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้
น้ำ	5.0 µl
10X Taq buffer	1.0 µl
1 mM each dNTPs	1.0 µl
5 µM each Primer mix	1.0 µl
0.25U/µl Taq DNA polymerase	1.0 µl
template	1.0 µl

การเตรียม 0.25 mM each dNTPs และ 5 µM each Primer mix ดูได้จาก ภาคผนวก ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

PCR condition มีดังนี้

- Denaturation ที่ 94° C นาน 10 นาที
- Denaturation ที่ 94° C นาน 30 วินาที, Annealing ที่ 53° C นาน 30 วินาที, Extension ที่ 72° C นาน 30 วินาที จำนวน 38 รอบ
- Final Extension ที่ 72° C นาน 10 นาที

การตรวจสอบผลการทดลอง

ตรวจสอบว่ามีผลผลิตของ PCR โดยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) เมื่อผลเป็นบวกจะปรากฏแถบดีเอ็นขนาด 223 bp ผลลบจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ในการทดลองจะต้องทำตัวควบคุมทั้งผลบวกและผลลบทุกครั้งเพื่อป้องกันผลบวกปลอมที่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อในส่วนผสมต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และผลลบปลอมที่อาจเกิดจากความผิดพลาดในส่วนของน้ำยาและขั้นตอนการทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved