บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ และอุปกรณ์ในการทดลอง

1. microcentrifuge tube ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 ml
2. เครื่อง Nano Drop
3. Pipette
4. ถุงมือ
5. Beaker
6. กระบอกตวง
7. Forceps
8. เครื่องชั่งสาร
9. Agarose Electrophoresis set
10. Hot plate stirrer
11. เครื่องเขย่า (shaker)
12. Incubator
13. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
14. pH meter
15. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
16. เครื่อง Gel doc.
17. นาฬิกาจับเวลา
18. เครื่อง UV light

2. สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. dNTPs
4. *Bst* DNA polymerase
5. 10X Bst Buffer
6. ผง Agarose
7. Ethidium bromine
8. KCl
9. 0.5 TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer
10. LAMP primer set
11. Tris-HCl
12. $(NH_4)_2SO_4$
13. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder
14. $MgSO_4$
15. 0.1% triton X-100
16. DNA template
17. Phenol Chloroform
18. Isopropanol
19. Ammonium Acetate
20. Betaine

3. วิธีการวิจัย

3.1 ตัวอย่าง และการเก็บตัวอย่าง

3.1.1 กำหนดขนาดตัวอย่าง

ตัวอย่างงานวิจัยเป็นตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (two independent sample) ชนิดของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นข้อมูลแบบไม่ต่อเนื่อง (discrete) และผลการทดลองอยู่ในรูปของสัดส่วนชายหญิง ดังนั้นจึงกำหนดขนาดตัวอย่างด้วยวิธีการประมาณค่าสัดส่วนของประชากร ซึ่งมีสูตรการหาขนาดตัวอย่าง (n) ดังนี้ (กิตติกา และคณะ, 2542)

$$n = \frac{(Z_{\propto}\sqrt{2\bar{P}\bar{Q}} + Z_{\beta}\sqrt{P_cQ_c + P_tQ_t})^2}{(P_c - P_t)^2}$$

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

P_c = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มควบคุม นั่นก็คือสารพันธุกรรมของเพศหญิง = 0

P_t = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มศึกษา นั่นก็คือสารพันธุกรรมของเพศชาย = 1

$Q_C = 1-P_c = 1$

$Q_t = 1-P_t = 0$

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

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

เนื่องจากงานวิจัยของ Nogami *et al*. ที่ทำการระบุเพศด้วยเทคนิคแลมป์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน ผลการวิจัยระบุว่าสามารถระบุเพศได้ 100% ดังนั้น ค่า P_c จึงเท่ากับ 0 และค่า P_t จึงเท่ากับ 1 และ

สัดส่วนชายหญิงเท่ากันนั่นคือ $n_t = n_c$ ค่า Lambda จึงเท่ากับ 1 แทนค่าในสูตรได้ดังนี้

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

n = 3.317 $\sim$ 4

ดังนั้นขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยควรจะไม่น้อยกว่า4 คน

งานวิจัยนี้จะวิเคราะห์การระบุเพศของมนุษย์ด้วยเทคนิคแลมป์ โดยใช้สารพันธุกรรมจากกลุ่มตัวอย่าง 30 คน แบ่งเป็นชาย 15 คน หญิง 15 คน เพื่อสะดวกต่อการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเทคนิค และการคำนวณค่าความผิดพลาดในทางสถิติต่อไป โดยมีสมมติฐานดังนี้

H_0 = เทคนิคแลมป์สามารถตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ไม่แตกต่างกัน

H_1 = เทคนิคแลมป์สามารถตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้แตกต่างกัน

3.1.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดสกัดเพศชายที่ไม่เกี่ยวข้องกันจำนวน 15 คน และตัวอย่างเลือดสกัดเพศหญิงที่ไม่เกี่ยวข้องกันจำนวน 15 คน

3.2 วิธีการทดลอง: การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการตรวจระบุเพศ

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจาก วิฑูรย์ และคณะ, 2005)

การสกัดดีเอ็นเอด้วย Chelex resin ดังนี้

1. ปิเปตตัวอย่างเลือดที่ได้จากประชากรตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าวนนาน 10-15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-30 นาที
2. ปั่นแยกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาที
3. ดูดเอาน้ำชั้นบนออกให้เหลือแต่ตะกอน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าวนนาน 10-15 วินาที แล้ว ปั่นแยกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีนาน 2 นาที
4. เติมน้ำแขวนลอย Chelex 5% ลงไปประมาณ 400 ไมโครลิตร ให้เม็ด Chelex ท่วมตะกอน

5. นำไปแช่อบที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเขย่าวนนาน 5-10 วินาที และนำไป ปั่นตก (Spin down)
6. นำหลอดทดลองไปต้มที่น้ำเดือด 8 นาที จากนั้นเขย่าวนนาน 5-10 วินาที และนำไป ปั่นตก
7. นำส่วนใสด้านบนไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

3.2.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการตรวจระบุเพศด้วยเทคนิคแลมป์

1. ปิเปตสารละลาย primer mix (inner primer 16 ไมโครโมลาร์, outer primer 2 ไมโครโมลาร์), *Bst* polymerase (8 U/µl), 10X buffer, betaine ความเข้มข้น 5 M, dNTPs ความเข้มข้น 2.5 mM each และดีเอ็นเอแม่แบบ ลงในหลอดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรรวมของสารละลายให้เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ปริมาตรสารที่ใช้ในแต่ละตัว แสดงไว้ในตาราง 1

Chemical	**Volume/1 tube**
H_20	10 µl
10X Buffer	2.5 µl
Betaine	4 µl
dNTPs	4 µl
Primer Mixs	2.5 µl
Bst.	1 µl
Template	1 µl
Total	25 µl

ตาราง 1 ปริมาณสารต่อหนึ่ง Tube LAMP

ลำดับ Sequence ของ primer เป็นดังนี้

Y-chromosome Specific Primer

FIP: 5’-aatccgaatggtcaggcagg-ccagtttaagctctgatggtt-3’

BIP: 5’-gactctttcctcctaaatatggctg-ttttgccctttcatggaac-3’

B3: 5’-ctggtcagtcagagttgac-3’

F3: 5’-ggtcccaattttacagttcc-3’

2. ทำการทดลองทั้งหมด 30 หลอดทดลองซึ่งใส่ดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการสกัดเลือดของกลุ่มตัวอย่างชายหญิงจำนวน 30 คน นำหลอดทั้งหมดไปแช่อบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

3.2.3 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์

นำผลิตผลของเทคนิคแลมป์ 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตรแล้วนำไปโหลดบนเจลอะกาโรสจากนั้นแช่เจลใน EtBr (Ethidium Bromide) นาน 30 นาที ดูผลเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

3.2.4 การตรวจสอบผลการตรวจระบุเพศ

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจล ดูผลเปรียบเทียบระหว่างเพศชายกับเพศหญิงว่าสามารถตรวจวัดยีน Amelogenin Y ได้แตกต่างกันหรือไม่

3.3 วิธีการทดลอง: การตรวจหาความไว (sensitivity)

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (ธานินทร์, 2538)

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม (Phenol - Chloroform) ดังนี้

1. ปิเปตน้ำสกัด Chelex 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาฟีนอล (Phenol) 300 ไมโครลิตร เขย่าวน 10 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที
2. แยกเอาน้ำชั้นบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
3. เติมน้ำยาคลอโรฟอร์ม (Chloroform) อีก 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าวน 10 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ดูดเอาส่วนน้ำสกัดข้างบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
4. แล้วเติมสิ่งต่อไปนี้ลงไปในหลอด
    1. ดูดน้ำสกัดจากหลอดที่แยกไว้มาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ 100 ไมโครลิตร
    2. เติม 4M NH_4AC(Ammonium Acetate) 100 ไมโครลิตร โดยเติมเข้าไปในอัตราส่วน 1:น้ำสกัด 1
    3. เติม 100% Isopropanol 200 ไมโครลิตร ซึ่งเติมเข้าไปในอัตราส่วน 2:น้ำสกัด1

    เมื่อเติมทั้งหมดเสร็จแล้วเขย่าวนนาน 10 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

5. ปั่นแยกที่ความเร็วนาน 13000 รอบ/นาที นาน 15 นาที
6. ดูดน้ำส่วนใส (Supernatant) ทิ้งให้ได้มากที่สุด
7. เติมแอลกอฮอล์ 70% 200 ไมโครลิตร
8. ปั่นแยกที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที
9. ดูด Supernatant ออกให้หมดแล้วเปิดฝาทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
10. เติมน้ำยา TE^{-4} (Tris 10 mM pH 8.5 ; 0.5 mM EDTA) ลงไป 20 ไมโครลิตรเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบต่อไป

3.3.2 วิธีการหาความไว (sensitivity)

การตรวจหาความไวจะกระทำโดยการใช้เทคนิคแลมป์ในการตรวจวัดดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มแล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop ทำการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอเป็น 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เท่า แล้วใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาแลมป์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

3.3.3 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคแลมป์

นำผลิตผลของเทคนิคแลมป์ 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตรแล้วนำไปโหลดบนเจลอะกาโรสจากนั้นแช่เจลใน EtBr (Ethidium Bromide) นาน 30 นาที ดูผลเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder