# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 1. กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาประกอบด้วยประชากรชาวไทยภูเขา 2 เผ่าคือ เผ่ากะเหรี่ยง บ้านแม่สวรรค์น้อย ต.แม่เหาะ อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน และเผ่าม้งบ้านม้งปางลุง บ้านม้งผานกกก บ้านม้งแม่ขิ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ. เชียงใหม่ และบ้านม้งดอยปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ซึ่งมีประวัติหมู่บ้าน ดังนี้

**บ้านแม่สวรรค์น้อย** ต.แม่เหาะ อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน เป็นหมู่บ้านกะเหรี่ยงสะกอมีการจัดตั้งมานานกว่า 130 ปี โดยชาวกะเหรี่ยงจาก บ้านแม่ริดป่าแก่ บ้านแม่เหาะ บ้านแม่ทะไน จ. แม่ฮ่องสอน ในระยะแรกใช้เป็นพื้นที่เพาะปลูกข้าวไร่ สร้างห้างนา เป็นที่พักชั่วคราวในฤดูกาลเพาะปลูก และต่อมาได้มีบางครอบครัวอาศัยอยู่ถาวร และเริ่มมีครอบครัวอพยพมาอยู่อาศัยจนเป็นชุมชนถาวร นอกจากนั้นมีการอพยพมาอยู่โดยจารีตประเพณีชายแต่งงานแล้วต้องมาอยู่บ้านภรรยา

ซึ่งในการศึกษานี้พบว่ามีชายดังกล่าวจำนวน 14 คน ในจำนวนนี้มีเพียง 1 คนที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ คือ จากหมู่บ้านอมลอง ต. บ่อสะลี อ. ฮอด อีก 13 คนล้วนมาจากหมู่บ้านซึ่งตั้งอยู่ในจังหวัดแม่ฮ่องสอนทั้งสิ้น ได้แก่ จาก ต. แม่เหาะ อ. แม่สะเรียง 3 คน เป็นคนหมู่บ้านปางหยาบ ปางฝาง และป่าหมาก หมู่บ้านละ 1 คน จาก ต. ป่าแป๋ อ. แม่สะเรียง 5 คน เป็นคนหมู่บ้านห้วยเดื่อ 4 คน และแม่ปุ๋น 1 คน มาจากบ้านแม่ลาย ต. ป่าโป่ง อ. สบเมย 2 คน จากบ้านขุนยวม ต.ขุนยวม 1 คน อีก 2 คนมาจากบ้านห้วยปูเลย ต. ห้วยปูลิง และบ้านน้ำส่อน ต. ผาบ่อง ใน อ. เมือง

**บ้านม้งผานกกก** ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ ประชากรในหมู่บ้านเป็นม้งขาว อพยพมาจากบ้านแม่สามาตั้งบ้านเรือนอยู่นานประมาณ 40 ปี แซ่ตระกูลในหมู่บ้านมี 5 แซ่ คือ แซ่เฒ่า แซ่ลี แซ่ย่าง แซ่โซ้ว แซ่ว่าง ปัจจุบันหมู่บ้านนี้เป็นสถานที่ท่องเที่ยวให้เข้าไปเยี่ยมชมวิถีชีวิตม้งได้

**บ้านม้งปางลุง** หรือบ้านม้งบวกเต๋ย ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ ประชากรในหมู่บ้านเป็นม้งขาว อพยพมาจากหมู่บ้านบ่อแก้ว บ้านผานกกก และบ้านโป่งแยง ตั้งหมู่บ้านอยู่ประมาณ 35 ปีมาแล้ว ในหมู่บ้านมี 5 แซ่ตระกูล คือ แซ่ว่าง แซ่เฒ่า แซ่ย่าง แซ่ลี และ แซ่โซ้ว

**บ้านม้งแม่ขิ** ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ ประชากรในหมู่บ้านเป็นม้งดำ หรือม้งน้ำเงิน อพยพมาจากบ้านม่อนเงาะ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ จัดตั้งมานาน 40 ปี แซ่ตระกูลในหมู่บ้านมี 5 แซ่ คือ แซ่หาง แซ่ว่าง แซ่เฒ่า แซ่ลี แซ่ย่าง

**บ้านม้งดอยปุย** อ.เมือง จ. เชียงใหม่ ประชากรเป็นชาวม้งดำ ตระกูลหยาง ตระกูลหวาง และตระกูลหลี่ อพยพมาจากเขตอำเภอแม่ริม ข้ามยอดดอยปุยเพื่อตั้งหมู่บ้านเมื่อปี พ.ศ. 2496 ภายหลังได้มีม้งตระกูลลี อพยพมาจากเขต อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ มาอยู่ที่บ้านดอยปุยด้วย

**2. การเก็บตัวอย่าง**

เก็บตัวอย่างเลือด (peripheral blood) พร้อมสัมภาษณ์ประวัติส่วนตัวและประวัติหมู่บ้านจากชาวไทยภูเขาเพศชายวัยเจริญพันธุ์ 2 เผ่าคือ เผ่ากะเหรี่ยง บ้านแม่สวรรค์น้อย ต.แม่เหาะ อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน จำนวน 21 คน และเผ่าม้งจำนวน 29 คนแบ่งเป็น บ้านม้งแม่ขิ บ้านม้งป่างลุง บ้านม้งผานกกก จำนวน 10 , 12 และ 5 คนตามลำดับ จาก ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และบ้านม้งดอยปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 2 คน

วิธีการเก็บตัวอย่าง

ใช้เข็มฉีดยา ซึ่งต่ออยู่กับกระบอกฉีดยา ขนาด 10 มล. เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณข้อพับแขน ดูดเลือด จำนวน 5 มล. ใส่ในหลอดที่มี ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็งตัว (anticoagglulant) 0.4 มล. กลับหลอดไปมาให้เลือดกับ EDTA ผสมเข้ากันดีแล้วเก็บในที่เย็น

**3. การสกัดดีเอ็นเอ**

ตัวอย่างเลือดที่ได้จะถูกทำลายเม็ดเลือดแดง แล้วนำเม็ดเลือดขาวมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีอินออร์แกนิก แยกโปรตีนออกด้วยเกลือเข้มข้นสูง และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยอัลกอฮอล์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1 นำตัวอย่างเลือดที่เก็บได้มาเติม red cell lysis buffer (RCLB) 10 มล. เขย่าไปมา เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก

2 ปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์

3 เติม RCLB อีก 10 มล. ปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์

4 ละลายตะกอนเซลล์ใน white cell lysis buffer (WCLB) 1.8 มล.

5 แบ่งตะกอนเซลล์ที่ละลายแล้ว 900 ไมโครลิตร เติม proteinase k ความเข้มข้น 20 มก.ต่อมล. ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

6 แช่ใน waterbath เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าบ้างเป็นบางครั้ง

7 เติมสารละลายเกลืออิ่มตัว (6 M NaCl) 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

8 เก็บสารละลายชั้นบน แบ่งใส่หลอดใหม่ 2 หลอด หลอดละ 600 ไมโครลิตร แล้วเติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ แช่เย็นจัด 1.2 มล. ในแต่ละหลอดพลิกกลับไปมาเบาๆ จะเห็นดีเอ็นเอตกตะกอนออกมา

9 ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนไว้ แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 1 มล. ทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer 100-200 ไมโครลิตร

10 นำไปตรวจสอบหาความเข้มข้นด้วย spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอเป็น ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร

**4. การเพิ่มขยายชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ด้วย polymerase chain reaction (PCR)**

นำเอาดีเอ็นเอที่สกัดได้มาขยายปริมาณ tetranucleotide repeat 3 ตำแหน่งบนโครโมโซม Y ด้วยวิธี PCR คือ ตำแหน่ง DYS19 (Roewer *et al.*, 1992) ใช้ primer DYS19.1 ( CTA CTG AGT TTC TGT TAT AGT )

DYS19.2 ( ATG GCA TGT AGT GAG GAC A )

ตั้งอยู่ที่ตำแหน่ง Yp มีหน่วยซ้ำเป็น GATA มีขนาดอัลลีลอยู่ในช่วง 182-206 คู่เบส

ตำแหน่ง DYS393 (Roewer *et al.*, 1996) ใช้ primer DYS393.1 ( GTG GTC TTC TAC TTG TGT CAA TAC )

DYS393.2 ( AAC TCA AGT CCA AAA AAT GAG G )

ตั้งอยู่ที่ตำแหน่ง Ypter-Yqter มีหน่วยซ้ำเป็น AGAT มีขนาดอัลลีลอยู่ในช่วง 120-132 คู่เบส

ตำแหน่ง DYS389 (Roewer *et al.*, 1996) ใช้ primer DYS389.1 (CCA ACT CTC ATC TGT ATT ATC TAT G )

DYS389.2 (TCT TAT CTC CAC CCA CCA GA )

ตั้งอยู่ที่ตำแหน่ง Ypter-Yqter จะได้ดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ขนาด อัลลีลขนาดเล็กหน่วยซ้ำอยู่ในช่วง 245-261 คู่เบส อัลลีลขนาดใหญ่หน่วยซ้ำอยู่ในช่วง 361-381 คู่เบส มีหน่วยซ้ำเป็น TCTG/TCTA

โดยอาศัยเอ็นไซม์ Tag polymerase จาก AmpliTaq Gold™ Kit ของบริษัท Perkin-Elmer

4.1 การเตรียมสารเพื่อทำปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลอง ขนาด 0.5 มล. จะประกอบด้วย

| | ความเข้มข้นสุดท้าย | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|---|---|---|
| น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ | - | 30.8 |
| 10X PCR Buffer | 1X | 5 |
| 25 mM $MgCl_2$ Solution | 3.5 mM | 7 |
| 10 mM dNTP | 800μM | 4 |
| Primers | 0.2μM | 2 |
| Template DNA | < 1μg | 0.5 |
| AmpliTaq Gold™ polymerase | 0.7 Unit | 0.7 |
| รวม | | 50 |

เติม mineral oil 1 หยด เพื่อป้องกันการระเหยของส่วนผสมขณะทำปฏิกิริยา

4.2 ดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิของ Hybaid Omn-E โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ตามลำดับดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| รอบที่ 1 | 95.0°C | 10 นาที เพื่อกระตุ้นเอ็นไซม์ Taq polymerase |
| รอบที่ 2 –34 | 94.0°C | 1 นาที (denaturation) |
| | 53.5°C | 1 นาที (annealing) |
| | 72.0°C | 1 นาที (extension) |
| รอบที่ 35 | 72.0°C | 7 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาทำงานได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น |

4.3 การตรวจสอบผลผลิต PCR

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยอะกาโรสเจล อิเล็คโตรฟอรีสีส (agarose gel electrophoresis) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ผงอะกาโรส 35 มิลลิกรัม ละลายใน 1X TBE buffer 35 มล. เทลงในแบบพิมพ์ วางหวี แล้วปล่อยให้แข็งตัว

เตรียมผลผลิต PCR ที่จะตรวจสอบโดยผสม loading dye 1 ไมโครลิตรกับผลผลิต PCR ที่แบ่งมา 7 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องของแผ่นวุ้น (well) ต่อวงจรไฟฟ้า โดยให้ตัวอย่างดีเอ็นเออยู่ทางขั้วลบใช้กระแสไฟฟ้าประมาณ 100 โวลท์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วย 1% Ethidium bromide 15 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เลือกผลผลิต PCR ที่ผ่านการเพิ่มขยายแล้วไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

**5. การหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว**

นำผลผลิต PCR มาแยกขนาดความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิเล็คโตรฟอริสีสที่มี polyacrylamide gel ความเข้มข้น 8% เป็นตัวกลางค้ำจุน ย้อมสีเจลด้วย silver ผลผลิต PCR จากตำแหน่ง DYS19 DYS393 DYS389 จะสามารถทราบขนาดได้จากการทำอิเล็คโตรฟอรีสีสเทียบกับ DNA molecular weight marker PhiX 174 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HaeIII (บริษัท Boehringer Manheim ประเทศไทย จำกัด) ที่ตำแหน่ง DYS389 ใช้ DNA molecular weight marker Lamda ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Pst I ประกอบกับการนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ในตำแหน่ง DYS389 บางตัวอย่างไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated sequencer เพื่อใช้เป็นมาตรฐานที่แน่นอนในการเปรียบเทียบ และอาศัยหลักการว่าผลผลิต PCR จากไมโครแซทเทลไลท์ดังกล่าว เป็น tetranucleotide repeat ฉะนั้นความผันแปรที่เกิดขึ้นจะเกิดขึ้นครั้งละ 4 คู่เบส

5.1 การเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 8%

ผสมผง acrylamide 19 กรัม และ bis acrylamide 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและไอออน ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มล. จะได้สารละลายเข้มข้น polyacrylamide 40% เก็บเป็น stock

polyacrylamide gel ที่จะใช้เตรียมให้ได้ความเข้มข้นความเข้มข้น 8% ดังนี้

| | |
|---|---|
| สารละลาย polyacrylamide 40% | 6 |
| 10X TBE buffer | 3 |
| น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและไอออน | 21 |

ได้ปริมาตรสารละลาย 30 มล. เมื่อผสมตามอัตราส่วน แล้วทิ้งไว้ 8-12 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายผสมกันดี จากนั้นเติม N, N, N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 16.5 ไมโครลิตร 10% Ammonium persulphate 165 ไมโครลิตร สารละลายอิ่มตัว Bromophenol blue 15 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน เทลงระหว่างแผ่นกระจกให้เต็มทันที แล้วใส่หวี ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้แผ่นเจลแข็ง ประมาณ 2 ชั่วโมง ดึงหวีออก

ประกอบแผ่นเจลที่แข็งดีแล้วเข้ากับเครื่องอิเล็คโตรฟอริสีสแบบ vertical เติม 1X TBE buffer แล้วจึงหยอดผลผลิต PCR ผสม loading dye ในอัตราส่วนและปริมาณเช่นเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.3 ต่อวงจรไฟฟ้า ใช้กระแสขนาด 70 โวลท์ เป็นเวลา 15-17 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของผลผลิต

5.2 การย้อมสีเจลด้วย silver

1. นำแผ่นเจลออกจากกระจกด้วยความระมัดระวัง
2. แช่แผ่นเจลในเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที
3. ย้ายแผ่นเจลลงแช่ในกรดไนตริก 1 เปอรเซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที
4. ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 5 วินาที
5. แช่แผ่นเจลในสารละลาย silver nitrate 0.012 M นาน 35 นาที
6. ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 5 วินาที
7. แช่แผ่นเจลในสารละลายผสมที่มี sodium carbonate 0.28 M และ formalin 0.019 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำ-น้ำตาล เททิ้งแล้วเทสารละลายผสมใหม่ลงไปทำหลายครั้งจนเห็นแถบดีเอ็นเอสีน้ำตาลปรากฏขึ้นชัดเจน
8. แช่แผ่นเจลลงในกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหยุดปฏิกิริยา เป็นเวลา 5 นาที
9. แช่แผ่นเจลในน้ำกลั่น เพื่อล้างกรดอะซิติกออก
10. นำแผ่นเจลที่ย้อมสีแล้วเก็บในถุงพลาสติก ใส่น้ำกลั่นเล็กน้อยปิดผนึกให้แน่น เพื่อให้แผ่นเจลมีน้ำหล่อเลี้ยงตลอดเวลา

**6. การหาความถี่อัลลีล**

เมื่อได้ข้อมูลขนาดของผลผลิต PCR สามารถนำมาหาความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งได้ โดย

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

$p_i$ คือ ความถี่ของอัลลีล $i$

$n_i$ คือ จำนวนของอัลลีล $i$ ในประชากร

$N$ คือ จำนวนประชากรทั้งหมดที่ศึกษาไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง

**7. การคำนวณเพื่อหาความแปรปรวนทางพันธุกรรม**

7.1 การวัดความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในเผ่าเดียวกัน จะทำการวัดในค่า gene diversity แบ่งเป็น

1) gene diversity ในแต่ละตำแหน่ง
2) gene diversity เฉลี่ย
3) haplotype diversity

ตามสมการ

1) gene diversity เมื่อพิจารณาแต่ละตำแหน่ง ($D$)

$$D = 1 - \left[\frac{n}{n-1}\left(\sum p_i^2\right)\right]$$

$D$ = gene diversity (Perez-lezaun *et al.*, 1999)

$N$ = จำนวนประชากรที่ศึกษา

$p_i$ = ความถี่ของอัลลีลที่ $i$

2) gene diversity ต่อตำแหน่ง ($\overline{D}$)

$$\overline{D} = \frac{\sum D}{r}$$

$\sum D$ = ผลรวมของ gene diversity ในแต่ละตำแหน่ง

$r$ = จำนวนของตำแหน่งที่ศึกษา

3) haplotype diversity

$$D_h = 1 - \left[ \frac{n}{n-1} \left( \sum p_i^2 \right) \right]$$

$D_h$ = haplotype diversity (Perez-lezaun *et al.*, 1999)

$N$ = จำนวนประชากรที่ศึกษา

$P_i$ = ความถี่ของแฮโปลไทป์ที่ $i$

7.2 การวัดระยะห่างทางพันธุกรรมของทั้งสองเผ่า (genetic distance between population) ประเมินด้วย

1) genetic distance ของแต่ละตำแหน่ง
2) genetic distance จากทุกตำแหน่ง
3) haplotype distance

ตามสมการ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

1) genetic distance ของแต่ละตำแหน่ง

$$D_L = -\ln\left(\frac{Gxy}{\sqrt{GxGy}}\right)$$

ln x หรือ $\log_e$ x คือ ลอการิทึมธรรมชาติ (natural log) โดย e มีค่าประมาณ 2.71828

$D_L$ = genetic distance ระหว่างประชากร X และ Y (Nei, 1978)

$p_i$ = ความถี่ของอัลลีล $i$ ในประชากร X

$q_i$ = ความถี่ของอัลลีล $i$ ในประชากร Y

$Gxy = \sum p_i q_i$

$Gx = \sum p_i^2$

$Gy = \sum q_i^2$

2) genetic distance จากทุกตำแหน่ง

$$D_T = -\ln\left(\frac{Jxy}{\sqrt{JxJy}}\right)$$

$D_T$ = genetic distance จากทุกตำแหน่ง (Nei, 1978)

$Jx$ = ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของ $\sum p_i^2$

$Jy$ = ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของ $\sum q_i^2$

$Jxy$ = ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของ $\sum p_i q_i$

3) haplotype distance

$$D_H = -\ln\left(\frac{Gxy}{\sqrt{GxGy}}\right)$$

$D_H$ = haplotype distance ของประชากร X และ Y

$p_i$ = ความถี่ของ haplotype $i$ ในประชากร X

$q_i$ = ความถี่ของ haplotype $i$ ในประชากร Y

$Gxy = \sum p_i q_i$

$Gx = \sum p_i^2$

$Gy = \sum q_i^2$

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

**8. การเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากร**

จะใช้ $\chi^2$ contingency test statistics เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากร ตามสมการ

$$\chi^2 = \sum \frac{(observed - \exp ected)^2}{\exp ected}$$

เมื่อ

| | | C1 | C2 | C3 | |
|---|---|---|---|---|---|
| R1 | obs | ... | ... | ... | R1T |
| | exp | (R1TxC1T)/T | (R1TxC2T)/T | (R1TxC3T)/T | |
| R2 | obs | ... | ... | ... | R2T |
| | exp | (R2TxC1T)/T | (R2TxC2T)/T | (R2TxC3T)/T | |
| | | C1T | C2T | C3T | T |

RiT คือ ผลรวมของแถว R ที่ i

CiT คือ ผลรวมของแถว C ที่ i

T คือ ผลรวมของ RiT หรือ CiT

R1 คือ ชาวไทยภูเขาเผ่ากะเหรี่ยง

R2 คือ ชาวไทยภูเขาเผ่าม้ง

C1, C2, C3 คือ อัลลีลที่พบในแต่ละตำแหน่ง

ค่า degree of freedom (df) = (R-1)(C-1)