

บทที่ 2

วิธีดำเนินการคั่นคว่ำ

สถานที่ทำการคั่นคว่ำ

1. ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. สวนคอกอณูพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 1. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml | 2. Gel dryer |
| 3. Microcentrifuge tube box | 4. Magnetic stirrer |
| 5. Microcentrifuge | 6. Shaker |
| 7. Micropipette | 8. Pipette ปริมาตร 10 ml |
| 9. Micro tips | 10. Beaker ปริมาตร 100, 250 และ 1000 ml |
| 11. Micro tips box | 12. Rubber bulb (ลูกยางดูดปิเปตต์) |
| 13. Water bath / Heat block | 14. ถาดสำหรับขั้วอมเจล |
| 15. Timer (นาฬิกาจับเวลา) | 16. ถุงมือ |
| 17. Vortex | 18. กระดาษขึงสาร |
| 19. Thermal cycler | 20. ขั้วนำสาร |
| 21. Electrophoresis set | 22. กระดาษปอนด์ |
| 23. PCR tube ขนาด 0.5 ml | 24. Balance (เครื่องชั่งสาร) |

สารเคมีในการทดลอง

- | | |
|-----------------|------------------------------------|
| 1. น้ำกลั่น | 2. Ammoniumpersulfate |
| 3. Proteinase K | 4. Tetramethylethylene-diamine |
| 5. Chelex | 6. Running buffer (Stock solution) |

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 7. Jump start® mastermix | 8. Nitric acid |
| 9. Primer mix (DYS390) | 10. Silver nitrate |
| 11. DNA template | 12. Sodium carbonate |
| 13. Gel buffer | 14. Formalin |
| 15. Acrylamide solution | 16. Glacial acetic acid |
| 17. Glycerol | 18. ตัวอย่างเลือดผู้ชาย |
| 19. ตัวอย่างเลือดผู้หญิง | 20. ตัวอย่างน้ำขับช่องคลอด |

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการค้นคว้า

ศึกษาจากผลตรวจ จากน้ำขับช่องคลอดของผู้เสียหายที่ถูกกระทำชำเรา ของภาควิชานิติเวช ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ช่วง 1 มกราคม 2550 – 31 ธันวาคม 2551 เป็นระยะเวลา 2 ปี

1.1 การกำหนดขนาดตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการค้นคว้าครั้งนี้ได้ทำตามวิธีการคำนวณ เพื่อการเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างประชากร 2 กลุ่ม ที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน (อรุณ, 2547) สมการ คือ

$$N = \frac{\left[Z_{\alpha} \sqrt{\frac{b}{c} + 1} + Z_{\beta} \sqrt{\left(\frac{b}{c} + 1\right) - p \left(\frac{b}{c} - 1\right)^2} \right]^2}{p \left(\frac{b}{c} - 1\right)^2}$$

เมื่อ N : จำนวนตัวอย่างที่ต้องใช้ในการค้นคว้าทั้งหมด

a, b, c, d : เป็นค่าจากตาราง Case control study ในงานวิจัยอ้างอิง

n : จำนวนตัวอย่างจากตาราง Case control study ในงานวิจัยอ้างอิง

p : $\frac{b}{n}$ หรือ $\frac{c}{n}$ ที่มีค่าน้อย

α : ค่าความเชื่อมั่น ที่ 95% $\alpha = 0.05$

β : ค่า Power of test ที่ 90% $\beta = 0.1$

Z_{α} : ค่า Standard score ของ α : $Z_{0.05} = 1.96$

Z_{β} : ค่า Standard score ของ β : $Z_{0.10} = 1.28$

ซึ่งในการคำนวณขนาดตัวอย่างตามสมการดังกล่าวได้ใช้งานวิจัยของ Chomont และคณะ (2001) อ้างอิง เนื่องจากเป็นงานวิจัยที่มีลักษณะของเนื้องานคล้ายคลึงกับการค้นคว้าที่กำลังศึกษาอยู่ โดย Chomont ได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจ PSA ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของการพบคราบอสุจิ กับ DNA ของ SRY gene ซึ่งผลการวิจัยสามารถนำมาทำเป็นตาราง Case control study ได้ดังนี้

ตาราง 1 การเปรียบเทียบระหว่างการตรวจ PSA กับ ดีเอ็นเอของ SRY gene

		DNA		Total
		+	-	
PSA	+	50 (a)	0 (b)	50
	-	50 (c)	164 (d)	214
Total		100	164	264 (n)

เมื่อนำค่าในตารางมาแทนค่าในสูตรการคำนวณจะได้ ดังนี้

$$N = \frac{\left[1.96 \sqrt{\frac{0}{50} + 1} + 1.28 \sqrt{\left(\frac{0}{50} + 1\right) - \frac{50}{264} \left(\frac{0}{50} - 1\right)^2} \right]^2}{\frac{50}{264} \left(\frac{0}{50} - 1\right)^2}$$

$$N = 51.24 \sim 52 \text{ ตัวอย่าง}$$

ดังนั้นขนาดของกลุ่มตัวอย่างสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมเพศชายที่ต้องใช้ในการค้นคว้า ควรจะไม่น้อยกว่า 52 ตัวอย่าง ซึ่งสำหรับการค้นคว้าในที่นี้ที่ต้องการจะเปรียบเทียบระหว่างการตรวจหาตัวอสุจิ กับ ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ของโครโมโซมเพศชาย ตำแหน่ง DYS390 จะใช้ตัวอย่างในการค้นคว้าทั้งหมด 60 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1. กลุ่มที่ตรวจพบตัวอสุจิ 30 ตัวอย่าง
2. กลุ่มที่ตรวจไม่พบตัวอสุจิ 30 ตัวอย่าง

ซึ่งรายละเอียดของตัวอย่างนำสืบช่องจากผู้เสียหายทั้งหมดได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

1.2 เงื่อนไขในการคัดเลือกตัวอย่าง

การคัดเลือกตัวอย่าง จะคัดเลือกตัวอย่างน้ำขับช่องคลอดจากผู้เสียหายที่ถูกกระทำชำเรา ที่มาตรวจที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยตัวอย่างทั้งหมดจะได้รับการตรวจหาตัวสุจิและเอนไซม์ Acid Phosphatase ตัวอย่างที่เหลือจะถูกเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยการคัดเลือกตัวอย่างจะมีเกณฑ์การคัดเข้าและคัดออก ดังนี้

1.2.1 เกณฑ์การคัดเข้าศึกษา

A : น้ำขับช่องคลอดซึ่งตรวจ Acid phosphatase ให้ผลบวก (color test < 60 sec หรือ ปริมาณ > 300 U/ml) แต่ตรวจไม่พบตัวสุจิ โดยจะคัดเลือกมาทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

B : น้ำขับช่องคลอดซึ่งตรวจ Acid phosphatase ให้ผลบวก (color test < 60 sec หรือ ปริมาณ > 300 U/ml) และตรวจพบตัวสุจิ โดยจะคัดเลือกมาทั้งหมด 30 ตัวอย่าง แต่ในกลุ่มตัวอย่างนี้สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้อีก 3 กลุ่ม ตามจำนวนตัวสุจิที่ตรวจพบ คือ กลุ่มที่พบตัวสุจิ ปริมาณ 1+, กลุ่มที่พบตัวสุจิปริมาณ 2+ และกลุ่มที่พบตัวสุจิปริมาณ 3+ ซึ่งการกำหนดปริมาณตัวสุจิที่ตรวจพบดูรายละเอียดของเกณฑ์การกำหนดได้จากข้อมูลในภาคผนวก ข.

1.2.2 เกณฑ์การคัดออก

A: น้ำขับช่องคลอดจากผู้เสียหายที่ถูกกระทำชำเราไม่เกิน 48 ชั่วโมง

B: น้ำขับช่องคลอดจากผู้เสียหายที่ถูกกระทำชำเรา โดยมีประวัติว่าผู้กระทำใส่ถุงยางอนามัย ขณะกระทำชำเรา

2. การสร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders)

2.1 ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ชายที่ทราบลักษณะทางพันธุกรรม ในตำแหน่ง DYS390 จำนวน 3 ราย เป็นตัวกำหนด ชนิดของอัลลีลที่ 24, 25 และ 26 ดังแสดงข้อมูลไว้ในภาคผนวก ค.

2.2 นำตัวอย่างดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) มาเพิ่มปริมาณ โดยเตรียม PCR mixture ลงใน PCR tube ขนาด 0.5 ml ดังนี้ น้ำยา Jump start 5.0 μ l, DNA template 1.0 μ l, Sterile water 3.0 μ l และ 5 μ M Primers mixture (ตำแหน่ง DYS390) 1.0 μ l.

2.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้โปรแกรมการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ดังนี้ Denaturation 94 °C นาน 45 วินาที, Annealing 55 °C นาน 30 วินาที และ

Extension 72 °C นาน 30 วินาที หลังจากนั้นปล่อยให้เครื่องทำงานไปจนครบ 40 รอบ แล้วพักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 7 นาที

- 2.4 นำ PCR product ที่ได้ไปแยกแอมป์ดิเอ็นเอเทียบกับแอมป์ดิเอ็นเอมาตรฐานโดยใช้กระแสไฟฟ้า 90 volt วิ่งผ่าน Running buffer นาน 16.5 ชั่วโมง (990 นาที)
- 2.5 ย้อมเจลด้วยเทคนิค Silver staining จนเกิดแอมป์ดิเอ็นเอชัดเจน
- 2.6 ตัดเจลแต่ละตำแหน่งที่เกิดแอมป์ดิเอ็นเอในช่วงขนาด 190 - 220 คู่เบส ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ปริมาตร 1 ml. โดยใส่หลอดละหนึ่งตำแหน่ง
- 2.7 ใช้ไม้จิ้มฟัน บดเจลให้ละเอียด
- 2.8 นำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที
- 2.9 ดูคือน้ำส่วนบนทิ้งให้มากที่สุด แต่อย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหายไป
- 2.10 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml ลงไปในหลอด นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2-3 นาที แล้วดูคือน้ำส่วนบนทิ้งไป (ทำซ้ำ 2 รอบ)
- 2.11 เติม Proteinase K (10 mg./ml.) ปริมาตร 2 μ l
- 2.12 เติมสารละลายแขวนลอย Chelex 5% ปริมาตร 200 μ l แล้วนำไปปั่น (Vortex) ให้เข้ากัน
- 2.13 นำไปแช่อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที
- 2.14 นำไปปั่น (Vortex) ประมาณ 5-10 วินาที แล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
- 2.15 หลังจากนั้นนำมาต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8 นาที
- 2.16 จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับขบวนการ PCR (ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 2-8 °C หรือ แช่แข็งก็ได้)

3. การสกัดดีเอ็นเอจาก น้ำขับช่องคลอดของผู้เสียหาย (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005)

ตัวอย่างที่คัดเลือกมา เป็นน้ำสกัดเซลล์จากไม้สวอบ ที่เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 °C ดังนั้น หลังจากตัวอย่างทั้งหมดละลายเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง จึงทำการสกัดดีเอ็นเอแบบไม่แยกชนิดเซลล์ (Total extraction) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

- 3.1 นำตัวอย่างที่คัดเลือกไว้ ซึ่งเก็บอยู่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml มาปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2-3 นาที
- 3.2 ดูดเอาน้ำส่วนบนทิ้งไป ให้มากที่สุด แต่อย่าให้ตะกอนตัวอย่างสูญหาย
- 3.3 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml ลงไปในหลอด จากนั้นนำไปเขย่าวน (Vortex) ให้เข้ากัน ก่อนที่จะนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2-3 นาที แล้วดูดน้ำส่วนบนทิ้งไป (ทำซ้ำ 2 รอบ เพื่อเป็นการล้างตะกอน)
- 3.4 เติม Proteinase K (10 mg./ml.) ปริมาตร 2 μ l
- 3.5 เติม 5% Chelex ปริมาตร 200 μ l แล้วนำไปเขย่าวน (Vortex) ให้เข้ากัน
- 3.6 นำไปแช่อบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที
- 3.7 นำไปเขย่าวน (Vortex) ประมาณ 5-10 วินาที แล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
- 3.8 หลังจากนั้นนำมาต้มในน้ำเดือด นาน 8 นาที
- 3.9 นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
- 3.10 จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับขบวนการ PCR (ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 2-8 °C หรือ แช่แข็งก็ได้)

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

- 4.1 เตรียม PCR mixture ลงใน PCR tube ขนาด 0.5 ml ซึ่งมีปริมาตรของสารรวมทั้งหมด 10 μ l ประกอบไปด้วย

1. น้ำยา Jump start 5.0 μ l
2. DNA template 4.0 μ l
3. DYS390 primer mix (5 μ M each) 1.0 μ l โดย Primer มีลำดับเบส ดังนี้

Primer F: 5'-TATATTTTACACATTTTGGGCC-3'

Primer R: 5'-TGACAGTAAATGAACACATTGC-3'

- 4.2 เมื่อเตรียม PCR mixture ข้างต้นเรียบร้อยแล้ว ก็นำไปปั่นตก (Spin down) ก่อนนำเข้าเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (Thermal cycles) โดยตั้งอุณหภูมิในแต่ละรอบ ดังนี้

Denaturation	94 °C	นาน	45 วินาที
Annealing	55 °C	นาน	30 วินาที
Extension	72 °C	นาน	30 วินาที

หลังจากนั้นปล่อยให้เครื่องทำงานไปจนครบ 40 รอบ แล้วพักทิ้งไว้ที่ 72°C นาน 7 นาที เราก็จะได้ PCR product เพื่อนำไปทำการแยกแแถบดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

5. การแยกแแถบดีเอ็นเอ โดยการผ่านกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis)

- 5.1 เตรียม 8.5% Acrylamide gel สำหรับใช้ในการแยกแแถบดีเอ็นเอ
- 5.2 นำ PCR Product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR ข้างต้นมาแยกแแถบดีเอ็นเอ โดยใส่ PCR Product ลงไปในหลุมของ Acrylamide gel
- 5.3 นำ Acrylamide gel ที่มี PCR Product อยู่ ไปแยกแแถบดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้า 90 volt วิ่งผ่าน Running buffer นาน 16.5 ชั่วโมง (990 นาที)

6. การย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005)

- 6.1 นำแผ่นเจลที่ได้หลังจากแยกแแถบดีเอ็นเอ ด้วยกระแสไฟฟ้าข้างต้น มาแช่ใน 1% Nitric acid แช่เป็นเวลา 10 นาที
- 6.2 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆละ 5-10 วินาที
- 6.3 แช่แผ่นเจลใน 0.012 M Silver nitrate solution แล้วแช่เป็นเวลา 20 นาที
- 6.4 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆละ 5-10 วินาที
- 6.5 เติมน้ำสารละลายของ 0.28 M Sodium carbonate และ 0.019% Formalin ปริมาณ 50 ml ลงไปรองจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลให้เทสารละลายนั้นทิ้งไป แล้วนำสารละลายที่เหลือทั้งหมดเติมลงไปใหม่ แช่จนเห็นแแถบดีเอ็นอบนแผ่นเจลชัดเจน
- 6.6 จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% Glacial acetic acid แช่เป็นเวลา 5 นาที
- 6.7 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆละ 5-10 วินาที (หรือล้างจนกว่าไม่มีกลิ่นของ Acetic acid)
- 6.8 นำแผ่นเจลที่ได้ไปทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง Gel dryer

7. การแปรผลการทดลอง

เปรียบเทียบแแถบ DNA ที่ตรวจพบจากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหายทั้ง 60 ตัวอย่าง กับอัลลีลมาตรฐานที่สร้างขึ้น เพื่อดูตำแหน่งและขนาดของแแถบ DNA ที่ตรวจพบ ว่าอยู่ช่วงขนาดที่คาดไว้หรือไม่ ถ้าใช่แสดงว่าให้ผลบวก (Positive test)

หลังจากได้ข้อมูลครบทั้ง 60 ตัวอย่างแล้ว ก็นำข้อมูลนั้นไปคำนวณค่าทางสถิติ เพื่อดูว่าโอกาสการตรวจพบดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมเพศชาย ในตำแหน่ง DYS390 มีความแตกต่างกับการตรวจพบตัวสุจิอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่