

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการตรวจวัตถุพยาน ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2550 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2554 และมีประวัติเข้ารับการตรวจภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากถูกกระทำชำเรา และเป็นตัวอย่างที่ตรวจเบื้องต้นโดยวิธี Acid phosphatase activity และ Sperm cytology แล้วได้ผลออกมา ดังนี้

- 1) ได้ผลที่เป็นบวกจากการตรวจวิธี Acid phosphatase activity แต่วิธี Sperm cytology ให้ผลที่เป็นลบ
- 2) ได้ผลที่เป็นบวกทั้งสองวิธี

โดยในกระบวนการรับตัวอย่างมาจากภาควิชานิติเวชศาสตร์ เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องจะปิดบังชื่อ สกุลจริงของผู้เสียหายและประวัติเหตุการณ์ที่จะนำไปสู่การทราบได้ว่าผู้เสียหายเป็นใครในคดีนั้น นับตั้งแต่ขั้นตอนการรับตัวอย่างมาทำวิจัย การนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ การลงผลวิเคราะห์และการรายงานผล

การกำหนดขนาดตัวอย่าง

โดยการคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อการเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างประชากร 2 กลุ่มที่ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มไม่เป็นอิสระต่อกัน สูตรที่ใช้ในการคำนวณขนาดตัวอย่าง คือ

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

โดยที่ n = ขนาดตัวอย่าง

b และ c = จำนวนหน่วยสังเกตในช่อง b และ c

$p = \frac{b}{n}$ หรือ $\frac{c}{n}$ ที่มีค่าเล็ก (ค่า b , c และ n นำมาจากรายงานวิจัยที่ผ่านมา)

จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Chomont และคณะ (2001) ในการตรวจหา Y chromosome จากน้ำ
 ชับช่องคลอดของผู้หญิงที่ผ่านการร่วมเพศโดยไม่มีการป้องกัน เพื่อตรวจหาการมีอยู่ของน้ำอสุจิ
 โดยใช้การตรวจหา Prostate specific antigen และตรวจดีเอ็นเอจาก Y chromosome ผลจาก
 การศึกษาดังแสดงในตาราง

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

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจน้ำจับช่องคลอดโดยวิธี Prostate specific antigen
 (PSA) กับดีเอ็นเอจาก Y Chromosome

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาจะได้ว่า $b = 0$, $c = 50$, $n = a + b + c + d = 264$

$$P = \frac{50}{264} = 0.189$$

$$\alpha = 0.05 \rightarrow Z_{0.05} = 1.96$$

$$\text{อำนาจการทดสอบ} = 0.9 \rightarrow Z_{0.1} = 1.28$$

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

$$= \frac{\left[1.96 \sqrt{0 + 1} + 1.28 \sqrt{(0 + 1) - 0.189(0 - 1)^2} \right]^2}{0.189(0 - 1)^2}$$

$$= 51.27$$

ขนาดตัวอย่างที่ต้องใช้ในการศึกษาไม่น้อยกว่า 52 ตัวอย่าง โดยการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างทั้งหมดเป็นจำนวน 60 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจากการตรวจวิธี Acid phosphatase activity แต่วิธี Sperm cytology ให้ผลที่เป็นลบ จำนวน 30 ตัวอย่าง และได้ผลที่เป็นบวกทั้งสองวิธี จำนวน 30 ตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจะประยุกต์ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบไม่แยกชนิดเซลล์ หรือ Total extraction (วิฑูรย์ และ ธานินทร์, 2005) โดยตัวอย่างที่ได้มานั้น จะมีลักษณะเป็นสารแขวนลอย (Suspension) บรรจุอยู่ในไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 ml ปริมาณ 300 μ l

1. ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะเห็นตะกอนสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ดูดน้ำชั้นบนออก
2. ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 มล. ดูดน้ำชั้นบนทิ้ง ให้เหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด ทำ 2 ครั้ง
3. เติมน้ำแขวนลอยของ Chelex 5% ลงไปประมาณ 200 ไมโครลิตรแล้วเติม 2 ไมโครลิตรของ proteinase K (10 mg/ml) ลงไป ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ

4. แห่อบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง นำไปเขย่าวนนาน 5-10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
5. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที
6. นำไปเขย่าวนอีก 10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
7. จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับกระบวนการ LAMP ส่วนดีเอ็นเอต้นแบบที่เหลือสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C หรือแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ให้ดำเนินการตามขั้นตอนที่ 6 และ 7 อีกครั้ง

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคลูปมีดีเอเตคไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (LAMP)

1. ในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดไว้ข้างต้น 2 ไมโครลิตร, primer mix (inner primer 1.6 μ M each, outer primer 0.2 μ M each), *Bst* polymerase (0.32 U/ μ l), 1X buffer , 0.8 M Betaine, 0.4 mM each dNTPs ลงในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรรวมของสารละลายให้เท่ากับ 25 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้ทั้งหมด 4 ตัวดังนี้ (Nogami et al, 2008)

FIP: 5'-aatccgaatggcagggcagg-ccagtttaagctctgatgggtt-3' (41 mer)

F1c (nt433-452)-F2 (nt382-402)

BIP: 5'-gactctttcctcctaaatatggctg-tttgccctttcatggaac-3' (44 mer)

B1c (nt453-477)-B2 (nt513-531)

B3: 5'-ctggtcagtcagagttgac-3' (nt533-551)

F3: 5'-gggtccaattttacagtcc-3' (nt349-368)

2. เมื่อปรับปริมาตรแล้ว นำมาแช่อบ(Incubation) ที่อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง PCR เป็นอุปกรณ์ในการแช่อบปฏิกิริยา

3. เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำ LAMP Product ที่ได้มาตรวจสอบผลว่ามีสารพันธุกรรมที่ตรวจหาอยู่หรือไม่ โดยการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) หากมีสาร

พันธุกรรมที่ต้องการจะปรากฏเป็นแถบที่มีลักษณะเป็นขั้นบันได หรือเรียกว่า ได้ผลเป็นบวก (Positive) หากไม่ปรากฏแถบลักษณะดังกล่าวแสดงว่าตรวจไม่พบ หรือเรียกว่า ได้ผลเป็นลบ (Negative)

ตัวควบคุมผลบวก (Positive control) และตัวควบคุมผลลบ (Negative control)

ตัวควบคุมผลบวกได้จากการนำน้ำอสุจิจากผู้วิจัยมาสกัดดีเอ็นเอแบบไม่แยกชนิดเซลล์ ตัวควบคุมผลลบใช้น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ (Sterile water)

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล (Location)

1. ห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่