

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 และ 1.5 ml
2. ปิเปต
3. ถังมือ
4. Forcep
5. ปีกเกอร์ (Beaker)
6. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
8. เครื่องชั่งสาร
9. Hot plate stirrer
10. Heating block incubator
11. Thermal cycler
12. Electrophoresis set
13. Ultraviolet-visible transilluminator
14. Gel documentation
15. นาฬิกาจับเวลา

สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. Proteinase K
4. dNTPs
5. 10X Taq buffer
6. Taq DNA polymerase
7. 5.0 μ M Primer mix (Cyt b Sus Scrofa)
8. 3.0 μ M Primer mix (Cyt b Homo sapiens)
9. Tris
10. 100 bp ladder
11. 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer
12. Agarose powder
13. Ethidium bromide
14. Boric acid
15. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

1.1 กำหนดขนาดตัวอย่าง

การกำหนดขนาดตัวอย่างด้วยวิธีการประมาณค่าสัดส่วนของประชากรโดยยอมให้เกิดค่าความคลาดเคลื่อน e ในกรณีที่ไม่ทราบค่า P ซึ่งมีสูตรการหาขนาดตัวอย่าง (ธีรวุฒิ, 2543)

$$n = \frac{Z^2}{4E^2}$$

โดยที่ n คือ จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ

Z คือ ระดับความเชื่อมั่น (ที่ $95\% = 1.96$)

E คือ ค่าสัดส่วนความคลาดเคลื่อนที่ผู้ศึกษาค้นคว้ายอมให้เกิดขึ้นได้ (15%)

แทนค่าในสูตรได้

$$n = \frac{(1.96)^2}{4(0.15)^2}$$

$$n = 42.68 \sim 43$$

ดังนั้นขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ต้องใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ต้องมีอย่างน้อย 43 ตัวอย่าง ซึ่งผู้จัดทำได้กำหนดใช้ขนาดตัวอย่างเป็น 45 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับสัตว์อื่น ได้แก่ ไก่ ปลา สุนัข และวัว อีก ชนิดละ 12 ตัวอย่าง

1.2 การเก็บตัวอย่าง

1.2.1 ตัวอย่าง ดีเอ็นเอ มนุษย์

นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ที่มีการสกัดไว้ในงาน การศึกษาความไวและความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์ยีนไซโตโครม บี ของมนุษย์ จากตัวอย่างคราบเลือด (อนุสรณ์, 2554)

1.2.2 ตัวอย่าง ดีเอ็นเอ สุนัข

เก็บตัวอย่างเลือดสุนัขจากร้านค้าเนื้อสุนัขในตลาดสดทั้งในจังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างเลือดสุนัข 1 ตัวอย่างต่อ 1 ร้านค้า จำนวน 45 ร้าน โดยนำเลือดสุนัขแต่ละตัวอย่างแยกบรรจุใน Microcentrifuge tube แล้วแช่แข็งระหว่างการเดินทาง เพื่อนำมาสกัดในขั้นตอนต่อไป

2. การตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค พิชีอาร์

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยวิธีการสกัดด้วย Chelex (ชานินทร์, 2538)

โดยอาศัยคุณสมบัติของเม็ด Chelating resin, Chelex-100 ที่เป็นด่าง (pH 10-11) และไม่ละลายน้ำซึ่งมีชื่อจริงคือ Iminodiacetic acid มีคุณสมบัติในการจับได้กับ โลหะหมู่ 2+ อย่างเช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} และอื่นๆที่มีประจุ 2+ อีกมากมาย ดังนั้นจึง สามารถสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ต่าง ๆ ได้โดยไม่ยุ่งยากและประหยัดเวลา เนื่องจาก ความเป็นด่างของ Chelex-100 และการต้มที่อุณหภูมิ 100 °C จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกสลาย พร้อมทั้งทำให้ดีเอ็นเอแปรสภาพ โดยมีขั้นตอนการ สกัดดังต่อไปนี้

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด (วิฑูรย์, 2005)

- ปิเปตเลือด 30 ไมโครลิตรใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. เติมน้ำกลั่นลงไป 1 มล. เขย่าวน (Vortex) ประมาณ 10-15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-30 นาที
- ปั่นแยกด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที
- ดูดเอาน้ำชั้นบนออกมากที่สุดจะเห็นตะกอนรวมเม็ดเลือดขาวตกอยู่ที่ก้นหลอด (ตะกอน อาจมีสีแดงปนเนื่องจากการตกตะกอนของฮีโมโกลบิน) เติมน้ำกลั่น 1 ml. เขย่าวนนาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก ปั่นล้างทั้งหมด 2 รอบ
- เติมน้ำสารแขวนลอย Chelex 5% ลงไปประมาณ 200 μl สังเกตให้เม็ด Chelex ท่วมตะกอน เม็ดเลือดขาวที่ก้นหลอดหรือไม่ หากยังไม่ท่วมให้เติมเฉพาะเม็ด Chelex ลงไปจนท่วมตะกอน
- แช่อบที่อุณหภูมิ 56 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนตะกอนถูกย่อยจนหมด จากนั้น นำมาเขย่าวน (Vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก
- นำหลอดทดลองไปต้มที่น้ำเดือดนาน 8 นาที
- นำไปเขย่าวน (Vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก
- จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับกระบวนการพิชีอาร์

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นขน (วิฑูรย์, 2005)

- ตรวจเส้นขนด้วยกล้องจุลทรรศน์ความีเยื่อหุ้มรากขน (Root sheath) หรือไม่
- ล้างเส้นขนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water) ในบีกเกอร์ ขนาด 50 มล.

- ตัดเอาโคนขนประมาณ 1 mm. จากปลายรากเป็นตัวอย่างที่ใช้สกัด
- ใส่โคนเส้นขนลงในหลอดทดลอง เติมน้ำแขวนลอย Chelex 5% ลงไป 200 μ l แล้วเติม 2 μ l ของ Proteinase K (10 mg. /ml.) ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอดเบาๆ
- ตรวจสอบให้แน่ใจว่าโคนเส้นขนนั้นจมอยู่ใต้เม็ด Chelex แล้วเขย่าหลอดทดลองที่ 37 °C นานประมาณ 30-60 นาที จากนั้นเขย่าวน (Vortex) ประมาณ 5-10 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที 10 วินาที (Spindown)
- นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที
- นำไปเขย่าวน (Vortex) ประมาณ 5-10 วินาที ปั่นแยก (Spindown) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับขบวนการพีซีอาร์

การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อ (วิฑูรย์, 2005)

- นำชิ้นเนื้อที่ได้ประมาณ 0.5 cm³. มาตัดให้มีขนาดเล็กมากที่สุด
- นำชิ้นเนื้อที่ละเอียดแล้วประมาณ 1 หัวไม้ขีดมาใส่ลงใน Micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นลงไป 1 ml.
- เขย่าวน (Vortex) นานประมาณ 5-10 วินาทีและนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วดูดน้ำชั้นบนทิ้ง
- ทำซ้ำข้อ 3 อีก 2 ครั้ง แล้วจึงดูดน้ำชั้นบนทิ้ง โดยเหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด
- เติมเม็ด Chelex ลงไปให้โดยให้ท่วมชิ้นเนื้อ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม Proteinase K ลงไป 2 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ
- เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที
- Vortex นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที (Spindown)
- นำหลอดทดลองไปต้มที่น้ำเดือดนาน 8 นาที
- Vortex นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
- จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับขบวนการพีซีอาร์

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR)

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ Primer 2 ชุด จึงทำให้ต้องหา Primer ที่เหมาะสมและจำเพาะกับงานนี้ ปริมาณและความเข้มข้นของสารที่จะผสมเป็น PCR mixture และ condition ของพีซีอาร์ ที่เหมาะสมอีกด้วย โดย PCR mixture ปริมาตรรวม 10 μ l ประกอบด้วย

- Sterile water
- 10X Taq buffer
- dNTPs (1 mM each)
- 0.25 U/ μ l Taq DNA polymerase
- 5 μ M Primer mix (*Sus scrofa* cyt b)
- 3.0 μ M Primer mix (Cyt b *Homo sapiens*)
- ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)

การหา condition ของพีซีอาร์ ที่เหมาะสมนั้นจะต้องลองหาว่าต้องมีช่วง Initial denaturation หรือไม่หากมีจะต้องใช้อุณหภูมิที่เท่าไร นานกี่นาที อีกทั้งอุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบของ Denature, Annealing และ Extension ว่าจะเหมาะที่เท่าไร

2.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยการทำ Agarose gel electrophoresis (วิฑูรย์, 2005)

ขั้นตอนการทำ Agarose gel electrophoresis

1.เตรียม 2% Agarose gel โดยมีวิธีเตรียมดังนี้

- ชั่ง Agarose powder 0.8 g
- ต้มใน 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer ที่ 60 °C จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันแต่มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ml

- เทใส่แม่พิมพ์ เสียบหัวไว้เพื่อให้เกิดหลุมแล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็ง

2.เตรียมเครื่อง Agarose electrophoresis เปิดและปรับการทำงานที่ 100V นาน 50 นาที

3.วางถาดเจลที่เตรียมไว้ลงในเครื่องแล้วเติม 0.5X TBE buffer ให้ท่วมเจลพอดี

4.เติม Loading dyes 1 μ l ลงใน PCR product และเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

5.โหลด ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder 5 μ l, Positive control, Negative control และ PCR product อย่างละ 5 μ l ลงในหลุมเจล

6.เมื่อครบเวลาจึงแช่เจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide นาน 30 นาที

7.นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Ultraviolet visible transilluminator เพื่อตรวจสอบผล

3. การประเมินค่าความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจงของวิธีการที่ใช้ระบุสารพันธุกรรมของมนุษย์และสุกร

3.1 ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง เนื้อไก่ วัว ปลา และขนสุนัข ชนิดละ 12 ตัวอย่าง

3.2 นำน้ำสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อที่ 3.1 มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยการทำ Agarose gel electrophoresis

3.3 วิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณค่าความถูกต้อง เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของวิธีการที่ใช้ระบุสารพันธุกรรมของมนุษย์และหรือสุกรด้วยการวิเคราะห์ขึ้นไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

4. ตรวจสอบว่าใน PCR product นั้นมีดีเอ็นเออยู่จริงหรือไม่

เพื่อการยืนยันว่า PCR product ของไก่ วัว ปลา และสุนัข ที่จะนำมาหาความจำเพาะของวิธีการหรือไม่ จึงจำเป็นต้องระบุให้ได้เสียก่อนว่า PCR product เหล่านั้นมีดีเอ็นเออยู่จริง จึงต้องนำมาทดสอบด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nano drop) โดยที่เครื่อง Nano drop จะวัดปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างโดยใช้หลักการของ การดูดกลืนแสงที่ความถี่สูง โดยเราต้องหยดตัวอย่างลงในช่องที่เป็นกระจกจำนวน 1-2 μl ต่อตัวอย่าง เครื่องก็จะวัดค่าและบอกว่า ตัวอย่างนั้นๆมีปริมาณดีเอ็นเออยู่เท่าไรมีหน่วยเป็น $\text{ng}/\mu\text{l}$