บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการอณูพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. microcentrifuge tube ขนาด 0.2 , 0.5 และ 1.5 ml
2. ก้านสำลี
3. ปิเปต
4. ถุงมือ
5. บีกเกอร์ (Beaker)
6. กระบอกตวง
7. forcep
8. เครื่องชั่งสาร
9. Electrophoresis Set ยี่ห้อ Bio Rad รุ่น Power Pac Basic
10. Hot plate stirrer ยี่ห้อ Digilog
11. เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ Major Science
12. ถาดสำหรับการย้อมเจล
13. เครื่องอบแห้งเจล (Gel dryer) ยี่ห้อ Thermo Electron Corporation
14. เครื่องเขย่าวน (Vortex) ยี่ห้อ Labnet
15. pH meter ยี่ห้อ Eutech instruments
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Centronix
17. เครื่องมือในการทำ PCR (PCR machine) ยี่ห้อ LongGene รุ่น MG96+
18. เครื่องชั่ง
19. Water bath / Heat block ยี่ห้อ Labnet
20. กระดาษปอนด์ 100 แกรม
21. นาฬิกาจับเวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. Proteinase K
4. Sterile water
5. dNTPs
6. 10X Taq buffer
7. Taq DNA polymerase
8. 10 µM Primer mix
9. Tris buffer pH 8.5
10. Acrylamide
11. 10X Gel buffer
12. Glycerol
13. 100 bp ladder
14. Tetramethylethylenediamine (TEMED)
15. 65% Nitric acid
16. Silver nitrate
17. Sodium carbonate
18. 37% Formaldehyde
19. 70% Ethanol
20. Sulfuric acid
21. boric acid
22. N,N'-methylene bisacrylamide
23. 1x TBE buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

1.1 การกำหนดขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากงานวิจัยเกี่ยวข้องกับกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน ข้อมูลที่ได้เป็นแบบไม่ต่อเนื่อง สูตรคือ

$$n = \frac{\left(Z\alpha\sqrt{PcQc} + Z\beta\sqrt{PtQt}\right)^2}{\left(Pc - Pt\right)^2}$$

Z_{α} = ค่า Z ที่ได้จากตารางมาตรฐาน เมื่อกำหนดความเชื่อมั่น 95% = 1.96

Z_{β} = ค่า Z ที่ได้จากตารางมาตรฐาน เมื่อกำหนด power of the test 90% = 1.28

P_t = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มศึกษา = 0.9

P_c = สัดส่วนการเกิดเหตุการณ์ที่สนใจในกลุ่มควบคุม = 0.74

Q_c = 1- P c = 0.26

Q_t = 1- P t = 0.1

$$\frac{\left\{1.96\sqrt{(0.74)(0.26)} + 1.28\sqrt{(0.9)(0.1)}\right\}^2}{(0.74 - 0.9)^2}$$

$$= 60.35$$

ดังนั้นจะต้องใช้ขนาดตัวอย่าง 61 คนเป็นอย่างน้อยแต่เพื่อให้ตัวเลขเหมาะสมจึงใช้ 70 คน

2.2 การเก็บตัวอย่าง

1.2.1 กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างในการทดลองคือ น้ำลายจากอาสาสมัคร จำนวน 70 คน

1.2.2 วิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus salivarius*

- ให้อาสาสมัคร ถ่มน้ำลายผ่านหลอดดูดน้ำลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ปริมาตรไม่ต่ำกว่า 1.0 ml
- ทำการแบ่งตัวอย่างที่ได้ให้ได้ปริมาตรที่เท่ากันคือ 1 ml
- ทำการเจือจางน้ำลายให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 ใน 100 ของความเข้มข้นเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำลาย

ประยุกต์ใช้วิธีของ Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ สำหรับงานนิติเวช ของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำน้ำลายที่ได้ทำการเจือจาง ปริมาณ 1 ml มาปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีจะเห็นตะกอนสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ดูดน้ำชั้นบนออก แบ่งใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เพื่อส่งตรวจเอ็นไซม์อะไมเลส

2.2 ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 1 ครั้ง ดูดน้ำชั้นบนทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด

2.3 เติม chelex ลงไปให้ท่วมตะกอน แล้วเติม 2 ไมโครลิตรของ proteinase K (10 มก./มล) และเติมน้ำ sterile 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ

2.4 แช่ที่อุณหภูมิ 55 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปเขย่าวน นาน 5 – 10 วินาที

2.5 นำหลอดทดลองไปต้มที่อุณหภูมิ 75 °C นาน 30 นาที

2.6 นำไปเขย่าวนอีก 10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 วินาที

2.7 จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2 – 8 °C หรือแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ ให้ดำเนินตามขั้นตอนที่ 2.6 และ 2.7 ตามต้องการ

3. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยเทคนิค PCR

การเตรียมตัวควบคุมผลบวก (positive control) และตัวควบคุมผลลบ (negative control)

ตัวควบคุมผลบวก ได้จากการนำโคโลนีของเชื้อ *Streptococcus salivarius* มาสกัด โดยป้ายโคโลนีเชื้อมาจุ่มในน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1 ml ปั่นเอาตะกอนของเชื้อไปสกัดตามวิธีการสกัดจากน้ำลาย

ตัวควบคุมผลลบ (negative control) ใช้ Sterile water

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ประยุกต์ใช้วิธีของ Suto et al., 2009 โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อในส่วนของ fructosyltransferase (ftf) gene and uracil phosphoribosyltransferase and ATP-dependent protease proteolytic subunit genes ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ใช้ Forward primer : 5'-ccagcggtaccaaaggtaaa-3'

Reverse primer : 5'-gcactcatccaattgtcacg-3'

แสดงลำดับเบสของเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในส่วนของ fructosyltransferase (ftf) gene and uracil phosphoribosyltransferase and ATP-dependent protease proteolytic subunit genes

```
1081  ctttatgtta  atacaccagg  tggatccgtt  tcggctggtc  ttgccattgt  tgatacaatg
1141  aacttcatca  agtctgatgt  tcagactatc  gttatgggga  tggcagcatc  tatgggaaca
1201  gttatcgctt  ccagcggtac  caaaggtaaa  cgtttcatgt  tgccaaatgc  agagtacatg
1261  attcaccaac  caatgggcgg  tactggtggc  ggtacgcaac  aaacagacat  ggctatcgca
1321  gctgaacact  tgctcaagac  acgtaataat  ttggagcaaa  tcttggcaga  taattctgga
1381  caaccaattg  aaaaagttca  tgtagacgct  gaacgtgaca  attggatgag  tgctcaagaa
1441  acgcttgaat  atggtttcat  cgatgaaatc  atggctaata  accaattaaa  ataaactgag
1501  cttgtcttaa  acaaaagtca  gat
```

ที่มา : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L07793.1 (GenBank: L07793.1)

ปฏิกิริยาเกิดในส่วนผสมที่มีปริมาตร 10 µl ซึ่งประกอบด้วย

น้ำ	5 µl
10X taq buffer	1 µl
dNTPs	1 µl
Taq DNA polymerase	1 µl
10µM primer mix	1 µl
template	1 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

PCR condition

denaturation ที่ 94 ^{O}C 10 นาที

denaturation ที่ 94 ^{O}C 30 วินาที , annealing ที่ 53 ^{O}C 30 วินาที , extension ที่ 72 ^{O}C 30 วินาที 38 รอบ

final extension ที่ 72 ^{O}C 10 นาที

(Suto et al., 2009)

ในการทดลองจะต้องทำตัวควบคุมทั้งผลบวก (positive control) และผลลบ (negative control) ทุกครั้ง เพื่อป้องกันผลบวกปลอมที่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อในส่วนผสมต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และผลลบปลอมที่อาจเกิดจากความผิดพลาดในส่วนของน้ำยาและขั้นตอนการทำ

การตรวจสอบผลของสารพันธุกรรมที่ได้

ทำการตรวจสอบว่ามี amplified PCR products เกิดขึ้นหรือไม่ ด้วยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis การตรวจสอบผลต้องใส่ตัวเทียบคือ 100 bp ladder ด้วยทุกครั้ง เพื่อประเมินขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ว่าเป็นไปตามคาดการณ์ไว้ และตรงกับแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างควบคุมผลบวกหรือไม่ ซึ่งถ้าได้ผลบวกก็จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 223 bp ส่วนผลลบจะไม่พบแถบดีเอ็นเอ

การทำซ้ำในกรณีไม่พบแถบดีเอ็นเอ

การไม่พบแถบดีเอ็นเอ เป็นไปได้ในหลายกรณีเช่น การที่ไม่มีเชื้ออยู่ในน้ำสกัดหรือมีน้อย เกิดความผิดพลาดในวิธีการทำ หรือข้อบกพร่องในส่วนของน้ำยาและสารเคมี การทำซ้ำในกรณีนี้จึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อช่วยยืนยันผลลบจริง

การทดลองนี้มีการทำซ้ำ 2 ครั้งเมื่อไม่พบแถบดีเอ็นเอ โดยทำซ้ำในลักษณะเดิมอีกครั้ง โดยทำตัวควบคุมทั้งผลบวกและผลลบ หากไม่มีข้อบกพร่องในส่วนของอุปกรณ์ น้ำยา สารเคมี และวิธีการ จะได้ผลที่ถูกต้องในส่วนของตัวควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 1 แสดงตัวอย่างการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus salivarius* โดยเทคนิค PCR

ช่อง 1 คือ ตัวควบคุมผลบวก (positive control)

ช่อง 2 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอมาตราฐาน(100 bp ladder)

ช่อง 3-12 คือ ผลบวก (พบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus salivarius*)

ช่อง 13 คือ ตัวควบคุมผลลบ (negative control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การตรวจเอนไซม์อะไมเลส

ทำการตรวจโดยเครื่อง Hitachi 917 โดยวิธีการEnzymatic photometric test

ชุดน้ำยาประกอบด้วย

R1:

Good's buffer	pH 7.15	0.1 mol/l
NaCl		50 mmol/l
MgCl2		10 mmol/l
α-Glucosidase		$\geq$ 2 kU/l

R2:

Good's buffer	pH 7.15	0.1 mol/l
EPS-G7		1.6 mmol/l

<u>หลักการ</u>

5 EPS-G7 + 5 H_2O $\xrightarrow{\alpha\text{-Amylase}}$ 2 Ethylidene-G5 + 2 G2PNP + 2 Ethylidene-G4 + 2 G3PNP + Ethylidene-G3 + G4PNP

2 G2PNP + 2 G3PNP + G4PNP + 14 H_2O $\xrightarrow{\alpha\text{-Glucosidase}}$ 5 PNP +14 G

EPS-G7 = 4,6-ethylidene-(G7)-p-nitrophenyl-(G1)-α- D-maltoheptaoside

PNP = p-Nitrophenol, G =Glucose

ตรวจวัดช่วงคลื่น	405 nm
อุณหภูมิ	37 °C
ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ	3 U/l

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>จำแนกตามระดับปริมาณเอนไซม์</u>

	หญิง	ชาย
น้ำเหลือง/น้ำเลือด	< 100 U/l	< 100 U/l
ปัสสาวะ	< 447 U/l	< 491 U/l

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงใช้ค่าเอนไซม์อะไมเลสที่มากกว่า 500 U/l จึงจะถือว่าเป็นน้ำลายเนื่องจากน้ำลายมีอะไมเลสที่สูงกว่า เลือด และ ปัสสาวะ

5. ประเมินผลการศึกษา

นำผลการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* เปรียบเทียบ การตรวจด้วยเอนไซม์อะไมเลส ว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ใช้การทดสอบสมมติฐาน โดย Chi-square test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved