บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

สวนดอกอณูพันธุศาสตร์ แผนกพยาธิวิทยาคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. Microcentrifuge Tube ขนาด 0.5 และ1.5 ml
2. ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ
3. ปิเปต
4. ถุงมือ
5. Forceps
6. บีกเกอร์ (Beaker)
7. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
9. เครื่องชั่งสาร
10. Hot Plate Stirrer
11. Thermal Cycler
12. Electrophoresis Set

สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Chelex
3. Proteinase K
4. 3.0 μM Primer Mix (Cyt b Bovine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. Tris
6. 100 bp Ladder
7. 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer
8. Agarose Powder
9. Ethidium Bromide
10. Boric Acid
11. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)
12. Jumpstart Red Taq จากบริษัท SIGMA

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

1.1 การกำหนดขนาดตัวอย่าง

สูตรการคำนวณหาขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่เหมาะสมโดยการประมาณค่าสัดส่วนของประชากร โดยยอมให้เกิดค่าความคลาดเคลื่อน e% ในกรณีที่ไม่ทราบค่า P (เอมอร, 2545) คือ

$$n = \frac{z^2}{4e^2}$$

$$n = \frac{(1.65)^2}{4(0.15)^2}$$

$$n = 30$$

โดย z คือ 1.65 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 90%) และ

e คือ 0.15 ความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้นในรูปของสัดส่วน

ดังนั้น ขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่เหมาะสมที่ต้องใช้ในการวิจัยครั้งนี้ควรไม่น้อยกว่า 30 ตัวอย่าง

1.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเส้นขนของวัวพันธุ์ไทยพื้นเมืองที่เลี้ยงเพื่อการจำหน่ายทั่วไปในเขตภาคเหนือของประเทศไทย เก็บโดยการถอนเพื่อให้รากติดอยู่ด้วยอย่างน้อย 5 เส้น โดยบรรจุในซองกระดาษเพื่อนำไปทำการตรวจสอบ ก่อนบรรจุต้องแน่ใจว่าเส้นขนนั้นๆ แห้งสนิทดีแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด (SOP DNA ANALYSIS, 2005)

- เจาะเลือดปริมาณ 1 มล. ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. ที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA อยู่ผสมให้เข้ากัน

- ปิเปตตัวอย่างเลือด 30 ไมโครลิตรใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 1 มล. เขย่าวน (Vortex) ประมาณ 10-15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-30 นาที

- ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที

- ดูดเอาน้ำชั้นบนออกมากที่สุดจะเห็นตะกอนรวมเม็ดเลือดขาวตกอยู่ที่ก้นหลอด (ตะกอนอาจมีสีแดงปนเนื่องจากการตกตะกอนของฮีโมโกบิน) เติมน้ำกลั่น 1 มล. เขย่าวนนาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก ปั่นล้างทั้งหมด 3 รอบ

- เติมสารแขวนลอย Chelex 5% ลงไปประมาณ 200 ไมโครลิตร สังเกตให้เม็ด Chelex ท่วมตะกอนเม็ดเลือดขาวที่ก้นหลอดหรือไม่ หากยังไม่ท่วมให้เติมเฉพาะเม็ด Chelex ลงไปจนท่วมตะกอน

- แช่อบที่อุณหภูมิ 56 ºC นานประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนตะกอนถูกย่อยจนหมด จากนั้นนำมาเขย่าวน (Vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก

- นำหลอดทดลองไปต้มที่น้ำเดือดนาน 8 นาที

- นำไปเขย่าวน (Vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก

- จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับกระบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 ºC หรือแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องนำมาใช้ใหม่ให้นำไปเขย่าวน (Vortex) นาน 5-10 วินาทีและนำไปปั่นตก ตามต้องการ

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นขน (SOP DNA ANALYSIS, 2005)

- ตรวจเส้นขนด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูว่ามีเยื่อหุ้มรากขน (Root sheath) หรือไม่

- ล้างเส้นขนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water) ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล.

- ตัดเอาโคนขนประมาณ 1 มม. จากปลายรากเป็นตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ

- ใส่โคนเส้นขนลงในหลอดทดลอง เติมน้ำแขวนลอย Chelex 5% ลงไป 200 ไมโครลิตรแล้วเติม 2 ไมโครลิตรของ Proteinase K (10 มก./มล.) ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอดเบาๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ตรวจดูให้แน่ใจว่าโคนเส้นขนนั้นจมอยู่ใต้เม็ด Chelex แล้วแช่อบหลอดทดลองที่ 37 ºC 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) สำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 ºC หรือแช่แข็งก็ได้

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (SOP DNA ANALYSIS, 2005)

PCR mixture ปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย

ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)	1 µl
Sterile water	3 µl
Jumpstart Red Taq	5 µl
3 µM Primer mix (Cytochrome *b* bovine)	1 µl

โดย Primer mix มีลำดับเบสดังนี้

Cytochrome *b* Bovine

Primer F : 5'-CAAGAACACTAATGACTAACATTCG-3'

Primer R : 5'-AAATGTTTGATGGGGCTGGA-3'

โดยอ้างอิงมาจาก Andreo et al., 2005

โปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่

Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 ºC นาน 3 นาที 1 รอบ จากนั้น

- Denature อุณหภูมิ 95 ºC นาน 15 วินาที
- Annealing ที่อุณหภูมิ 55 ºC นาน 60 วินาที
- Extension ที่อุณหภูมิ 72 ºC นาน 60 วินาที ทั้งหมด 35 รอบ

2.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ที่ได้ด้วยการทำ Agarose gel electrophoresis (SOP DNA ANALYSIS, 2005)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การประเมินค่าความถูกต้องและความจำเพาะของวิธีการใช้ระบุสารพันธุกรรมของวัว

3.1 ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของมนุษย์ สุนัข หมู ปลา และไก่ ชนิดละ 5 ตัวอย่าง (SOP DNA ANALYSIS, 2005)

3.2 นำน้ำสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อที่ 3.1 มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากนั้นทำการตรวจสอบผลพีซีอาร์ด้วยการทำ Agarose gel electrophoresis

3.3 วิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณค่าความถูกต้อง เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความจำเพาะของเทคนิคที่ใช้ระบุสารพันธุกรรมด้วยยีน Cytochrome *b* ในไมโตคอนเดรีย เพื่อนำมาใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved