บทที่ 3

วิธีดำเนินการค้นคว้า

สถานที่ทำการค้นคว้า

1. ศูนย์สวนดอก อณูพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 และ 1.5 ml
2. Micropipette
3. Micro tips
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
5. เครื่องเขย่า (Shaker)
6. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
7. Thermal cycler
8. Electrophoresis set
9. Beaker
10. Magnetic stirrer
11. Hot plate stirrer
12. นาฬิกาจับเวลา
13. ช้อนตักสาร
14. เครื่องชั่งสาร
15. ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ
16. ถุงมือ
17. ไม้พันสำลีฆ่าเชื้อ

สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. Proteinase K
3. Chelex
4. 10X *Taq* buffer
5. dNTPs
6. *Taq* DNA-polymerase
7. 1 μM Primers mixture (human Cyt b)
8. DNA Template
9. Agarose powder
10. 0.5X TBE buffer
11. 100 bp Ladder
12. Ethidium Bromide
13. Loading dry
14. ตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์
15. ตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์
16. ตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากสัตว์อื่น ได้แก่ ไก่ สุนัข หมู และวัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้

1.1 ตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ ที่สกัดจากเลือด

1.2 ตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ ที่สกัดจากคราบเลือด

1.3 ตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ ที่สกัดจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ คราบเลือดไก่ ปมรากขนของสุนัข หมู และวัว

2. การกำหนดขนาดตัวอย่าง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เป็นการศึกษาเพื่อการประมาณค่าประชากรจากกลุ่มตัวอย่างโดยใช้วิธีการประมาณค่าสัดส่วนประชากร แบบไม่ทราบจำนวนประชากรที่แท้จริง และไม่ทราบค่าสัดส่วนของตัวอย่าง จึงใช้การคำนวณหาขนาดกลุ่มตัวอย่าง (n) ที่ได้กำหนดค่าสัดส่วนของตัวอย่าง (p) ให้มีค่าเป็น 0.5 เมื่อกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% จากสูตร (สมพงษ์ พันธุรัตน์, 2553)

$$n = \frac{Z^2 p(1-p)}{e^2}$$

เมื่อ n คือ ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

Z คือ ค่าคะแนนมาตรฐานจากการเปิดตารางแจกแจงแบบปกติที่ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด

e คือ ค่าสัดส่วนความคลาดเคลื่อนที่ผู้ศึกษาค้นคว้ายอมให้เกิดขึ้นได้

p คือ ค่าสัดส่วนของตัวอย่างที่ผู้ศึกษาค้นคว้าสนใจ

แทนค่า Z = 1.96 , e = 0.15 , p = 0.5

จะได้ $$n = \frac{1.96^2(0.5)(1-0.5)}{0.15^2}$$

$$= 42.68$$

$$\approx \mathbf{43}$$

ดังนั้น ขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ต้องใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ต้องมีอย่างน้อย 43 ตัวอย่าง ซึ่งผู้ทำการศึกษาค้นคว้าได้กำหนดใช้ขนาดตัวอย่างเป็น 45 ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์ที่กำหนดใช้ 45 ตัวอย่าง ควรจะใช้ขนาดตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์อย่างน้อย ชนิดละ 25 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อทำการตรวจสอบแล้วต้องไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยกำหนดเป็นระดับความเชื่อมั่นที่ 95% และความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 15% จากสูตรของ R.V.Krejcie และ R.W.Morgan (อนุรักษ์ โชติดิลก, 2554) ดังนี้

$$n = \frac{0.9604N}{(N-1)e^2 + 0.9604}$$

เมื่อ n คือ ขนาดของกลุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์

N คือ จำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์ (N = 45)

e คือ ค่าสัดส่วนความคลาดเคลื่อนที่ผู้ศึกษาค้นคว้ายอมให้เกิดขึ้นได้ (e = 0.15)

แทนค่า N = 45 , e = 0.15

จะได้

$$n = \frac{0.9604(45)}{(45-1)(0.15)^2+0.9604}$$

$$= 22.16$$

$$\approx \mathbf{25}$$

3. เตรียมตัวอย่างคราบเลือดและการสกัดดีเอ็นเอ

3.1 การเตรียมตัวอย่างคราบเลือด

เตรียมตัวอย่างคราบเลือดบนผ้าฝ้ายสีขาวที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ (Autoclave) แล้วหยดเลือดปริมาตร 100 µl ลงบนผ้า จากนั้นผึ่งตัวอย่างเลือดให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากคราบเลือด (วิฑูรย์ ทะสุยะ และ ธานินทร์ ภู่พัฒน์, 2005)

ตัดผ้าที่มีคราบเลือดติดอยู่มาขนาดประมาณ 5x5 mm แล้วตัดคราบนั้นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอดทดลอง (microcentrifuge tube) เติมน้ำกลั่นลงไป 1 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 30 นาที โดยเขย่าหลอดเป็นครั้งคราวเพื่อให้แน่ใจว่าเลือดละลายออกมากที่สุด จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่สะอาดเขี่ยเอาเศษผ้าออก แล้วนำหลอดทดลองไปเขย่าวน นาน 5-10 วินาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ใช้ pipette ดูดเอาน้ำส่วนบนทิ้งไปจะเห็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด แล้วเติมน้ำแขวนลอย Chelex 5% ลงไป 200 µl และเติมเฉพาะเม็ด Chelex ลงไปอีกจนท่วมตะกอนก้นหลอด จากนั้นแช่อบไว้ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 1 ชั่วโมง หรือจนตะกอนละลายหมดแล้วนำไปเขย่าวน ประมาณ 5-10 วินาที ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาทีอีกครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 8 นาที แล้วทำการเขย่าวน ประมาณ 5-10 วินาที ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาทีอีกครั้ง ก่อนจะนำน้ำส่วนบนซึ่งมีดีเอ็นเอไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับกระบวนการ PCR ต่อไป และหลังจากใช้แล้วเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C หรือแช่แข็งเพื่อการใช้ในครั้งต่อไป

3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด (วิฑูรย์ ทะสุยะ และ ธานินทร์ ภู่พัฒน์, 2005)

เจาะเลือดปริมาณ 1 µl ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA อยู่ ผสมให้เข้ากัน จากนั้น pipette ตัวอย่างเลือด 30 µl ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อีกหลอด แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 1 ml นำไปเขย่าวนประมาณ 10-15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 15-30 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วดูดเอาน้ำส่วนบนออกมากที่สุดทิ้งไปจะเห็นตะกอนรวมเม็ดเลือดขาวตกอยู่ที่ก้นหลอด (ตะกอนอาจมีสีแดงปน เนื่องจากการตกตะกอนของฮีโมโกลบิน) ต่อจากนั้นเติมน้ำกลั่น 1 ml นำไปเขย่าวนและปั่นแยกแบบเดิมอีกครั้ง หลังจากนั้นเติมน้ำแขวนลอย Chelex 5% ลงไป 200 µl และเติมเฉพาะเม็ด Chelex ลงไปอีกจนท่วมตะกอนก้นหลอด จากนั้นแช่อบไว้ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 1 ชั่วโมง หรือจนตะกอนละลายหมด แล้วนำไปเขย่าวน ประมาณ 5-10 วินาที ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที อีกครั้ง หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 8 นาที แล้วทำการเขย่าวน ประมาณ 5-10 วินาที ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ก่อนจะนำน้ำส่วนบนซึ่งมีดีเอ็นเอไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับกระบวนการ PCR ต่อไป และหลังจากใช้แล้วเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C หรือแช่แข็งเพื่อการใช้ในครั้งต่อไป

3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นขนสัตว์ (วิฑูรย์ ทะสุยะ และ ธานินทร์ ภู่พัฒน์, 2005)

ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเลือกเอาเส้นขนที่มีเยื่อหุ้มรากขน อย่างน้อย 5 เส้น ต่อ 1 ตัวอย่าง ทำการล้างเส้นขนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water) ในบีกเกอร์ ขนาด 50 ml จากนั้นตัดเอาโคนขนประมาณ 1 cm จากปลายรากเพื่อเป็นตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วเติมน้ำแขวนลอย Chelex 5% ลงไป 200 µl และเติม 2 µl ของ Proteinase K (10 mg/ml) ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอดเบาๆ โดยตรวจดูให้แน่ใจว่าโคนเส้นขนนั้นจมอยู่ใต้เม็ด Chelex แล้ว นำไปแช่อบที่ 37 ºC นานประมาณ 30-60 นาที จากนั้นเขย่าวน ประมาณ 5-10 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที ก่อนนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที ต่อด้วยนำไปเขย่าวนและปั่นแยกแบบเดิมอีกครั้ง และใช้น้ำส่วนบน ไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับกระบวนการ PCR ส่วนตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 ºC หรือแช่แข็งก็ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. Primer และสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR

primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีความจำเพาะต่อลำดับเบสในส่วนของยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ จาก Matsuda H. (2005) คือ

Primer F : 5′ –TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT– 3′

Primer R : 5′ –ACTTGTCCAATGATGGTAAAAGG– 3′

สภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR

PCR reaction mixture ใน microcentrifuge tube ปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย

1. sterile water	4 µl
2. 10X *Taq* buffer	1 µl
3. 1 mM dNTPs	1 µl
4. 1:20 *Taq* DNA-polymerase	1 µl
5. 1 µM each Primer Mix	2 µl
6. DNA Template (ดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดไว้ข้างต้น)	1 µl

ดำเนินการทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 32 รอบ ในเครื่อง Thermal cycler โดยปรับอุณหภูมิและเวลาของแต่ละรอบ คือ

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 96 ^{o}C	นาน 30 วินาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 59 ^{o}C	นาน 40 วินาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}C	นาน 1 นาที

5. ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบความจำเพาะ และความไว

5.1 การตรวจสอบความจำเพาะ

5.1.1 นำดีเอ็นเอแม่แบบทั้ง 45 ตัวอย่าง ที่สกัดมาจากคราบเลือด มาดำเนินการทำปฏิกิริยา PCR โดยทำการผสม PCR reaction mixture ตามที่กล่าวข้างต้นแล้ว ซึ่งใน 1 หลอดทดลอง คือ 1 ปฏิกิริยา PCR จะใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ 1 ตัวอย่าง จากนั้นนำ PCR reaction mixture ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที ก่อนนำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ได้ตั้งโปรแกรมการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิตามสภาวะที่เหมาะสม เมื่อเครื่องทำงานเสร็จ จะได้ PCR product นำไปตรวจดูผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยทำการแยกแถบดีเอ็นเอต่อไป

5.1.2 ทำการตรวจพิสูจน์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ ได้แก่ ไก่ สุนัข หมู และวัว ชนิดละ 25 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ทำการผสม PCR reaction mixture ตามที่กล่าวข้างต้นแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ใช้ DNA template ที่สกัดจากสัตว์แทน) โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ 1 ตัวอย่าง ต่อ 1 ปฏิกิริยา PCR ใน 1 หลอดทดลอง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermal Cycler ตามที่ได้ตั้งโปรแกรมสภาวะที่เหมาะสมไว้ ก่อนนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจดูด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอต่อไป

5.2 การตรวจสอบความไว

นำดีเอ็นเอแม่แบบ ที่สกัดจากคราบเลือดมนุษย์ ทั้ง 45 ตัวอย่าง มาทำการเจือจางความเข้มข้นในลำดับส่วนดังนี้ 1:10, 1:100, 1:1000 และ 1:10000 แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางในแต่ละลำดับส่วนมาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้วจึงนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis

6. การตรวจดูผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

6.1 เตรียม 2% agarose gel โดยชั่ง agarose powder 0.8 gm เทใส่บีกเกอร์ แล้วเติม 0.5X TBE buffer 40 ml นำไปต้มเพื่อให้ agarose powder ละลาย ที่อุณหภูมิ 60 °C ใช้ magnetic stirrer คนผสมสารให้เข้ากัน จนเห็นว่าสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทลงในถาดรองเจล ที่วางบนพื้นเรียบ แล้วเสียบหวีสำหรับสร้างหลุม 13 หลุม ลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดรองเจล ให้ซี่ของหวีอยู่ห่างจากปลายของเจล ประมาณ 1 cm ทิ้งไว้รอให้เจลแข็งตัว ประมาณ 1-2 ชั่วโมง

6.2 หลังจากเจลแข็งตัว ค่อยๆ ดึงหวีออก นำถาดเจลไปวางในเครื่อง electrophoresis เท buffer (0.5X TBE buffer) ลงไปจนท่วมเจล ให้ buffer ท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 mm

6.3 ผสม PCR product กับสีย้อม (loading dye) 1 µl ต่อ 1 หลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงประมาณ 30 วินาที แล้วหยอด PCR product ที่ผสมสีย้อมแล้วลงในหลุมเจล โดยใช้ micropipette ในการทำอิเล็กโทรโฟริซิสทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp) ที่รู้ขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมักจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในหลุมซ้ายมือสุด ถัดมาคือ PCR product ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดสดของมนุษย์ (positive control) และขวามือสุดของหลุมเป็น PCR product ที่ได้จากการใช้ DNA template เป็นน้ำกลั่น (negative control)

6.4 เมื่อหยอด PCR product เรียบร้อยทุกหลุมแล้ว ปิดฝาครอบของเครื่อง electrophoresis แล้วปรับตั้งค่าเครื่อง โดยใช้ voltage 100V ค่ากระแสไฟฟ้า 50 mA เป็นเวลานาน 25 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาที่ตั้งไว้ นำแผ่นเจลออกมาแช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 30 นาที จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่อง Ultraviolet-visible

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การแปลผลการทดลอง

ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วแปลผลจาก 2 ใน 3 ครั้ง โดย

- เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอ ที่ตรวจพบหลังจากทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากคราบเลือดมนุษย์ ทั้ง 45 ตัวอย่าง กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน positive control และ negative control เพื่อดูตำแหน่งและขนาดแถบดีเอ็นเอว่าอยู่ในช่วงขนาดที่คาดไว้ คือ ประมาณ 157 bp หรือไม่ ถ้าใช่ถือว่าเป็นผลบวก

- เปรียบเทียบตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์อื่น ซึ่งได้แก่ ไก่ สุนัข หมู และวัว ชนิดละ 25 ตัวอย่าง กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน positive control และ negative control เช่นกัน ซึ่งต้องไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจากสัตว์ (ผลลบ)

- ตรวจดูแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือด ที่ถูกเจือจางความเข้มข้นที่ลำดับส่วน 1:10 1:100 1:1000 และ 1:10000 ทั้งหมด

แล้วนำผลที่ได้ทั้งหมดไปคำนวณค่าทางสถิติ และสรุปผลการใช้ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุว่าเป็นดีเอ็นเอของมนุษย์ จากตัวอย่างคราบเลือด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved