บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ประชากรตัวอย่างและแผนการทดลอง

การศึกษานี้ออกแบบเป็น case control design โดยมีมูลด้านประชากรศาสตร์ มีตัวอย่างซีรั่ม ปัสสาวะ และอุจจาระ ร่วมกับโครงการที่ผ่านมาซึ่งทำการศึกษาหาโรคระบบท่อน้ำดีและการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในสถานการณ์ปัจจุบัน ณ.อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น

การคำนวณประชากรตัวอย่าง

คำนวณจำนวนคู่ของกลุ่มทดลอง (cases) คือผู้ที่ตรวจพบความผิดปกติของท่อน้ำดี (Advance periductal fibrosis) และกลุ่มผู้ที่มีท่อน้ำดีปกติ (controls) ที่มีประวัติ exposure outcome ไม่เหมือนกันตามสูตรการคำนวณดังนี้

$$m = [Z_{\alpha}/2 + Z_{\beta} \sqrt{p(1-p)]^2 / (p-1/2)^2}$$

$$p = R/(1+R)$$

โดย\ในที่นี้ m = จำนวนคู่ของ cases และ controls ที่มีประวัติ exposure outcome ไม่เหมือนกัน

P_0 = คนปกติของประชากรเป้าหมายได้รับองค์ประกอบ (exposure)

R= ค่าความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลังได้รับ exposure

ระดับความเชื่อมั่น $\alpha = 0.05$

$\beta = 0.10$

P_0 = ค่าสัดส่วนของกลุ่มคนปกติที่มีระดับแอนติบอดีสูงแต่ไม่เป็นโรคคือ 0.067

R = ค่าโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีในกลุ่มคนที่มีระดับแอนติบอดีสูง คือ 5, (Parkin และคณะ 1991)

จากนั้นคำนวณจำนวนคู่ทั้งหมด (M) โดยใช้สูตร

$$M = m/Pe$$

$Pe = (p_0q_1 + p_1q_0)$ ความน่าจะเป็นของประวัติการ exposure ในคู่ที่มีผลต่างกัน

โดย $p_1 = p_0R/[1 + p_0(R-1)]$

$q_1 = 1 - p_1$

$q_0 = 1 - p_0$

เมื่อแทนค่าทั้งหมดในสูตรจะได้ขนาดตัวอย่าง = 64.59 คู่ หรือประมาณ 65 คู่ โดยแบ่งเป็นกลุ่ม cases 65 ราย และกลุ่ม controls 65 ราย

2.2 การเก็บตัวอย่าง

ซีรัม: เก็บตัวอย่างเลือด 3-5 ซีซี ปล่อยให้เลือดแข็งตัว แล้วทำการปั่นแยกซีรัม ดูดเก็บส่วนซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ-20°C

ดีเอ็นเอ: เก็บตัวอย่างเลือด 3-5 ซีซี ใส่สารกันเลือดแข็งตัว (heparin) จากหลอดเลือดดำ แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว นำไปสกัด genomic DNA โดยใช้ DNA extraction kit (Qiagen) และเก็บไว้ที่ -20 °C

2.3 การตรวจหา polymorphism ของยีน GST โดยเทคนิค PCR

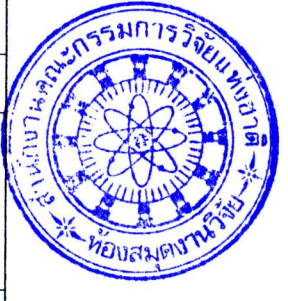
เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย

1) Primer: GSTM1, GSTT1, CYP1A1
2) DNA template
3) 10x PCR buffer
4) dNTP Mixture
5) Taq DNA polymerase
6) น้ำกลั่น

ในการทำ PCR ทุกครั้งต้องมีหลอดทดสอบที่เป็น Blank คือหลอดที่ไม่ได้เติม DNA ต้นแบบเพื่อตรวจสอบว่ามีการเพิ่มจำนวนของ DNA ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นเนื่องจากมีการปนเปื้อนของ DNA ใน ขั้นตอนการทำ PCR หรือไม่ และมีหลอดที่เป็น positive control คือหลอดที่เติม DNA ต้นแบบของพยาธิใบไม้ตับ โดยทำควบคู่ไปด้วยกันเสมอกับการทำ PCR ของตัวอย่าง ทุกขั้นตอนของการเตรียม PCR reaction ทำในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็ง

นำหลอด PCR ที่เติมส่วนประกอบทั้งหมดนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มจำนวน DNA โดยมีขั้นตอนดังนี้

Step	Temperature (^{0}C)	Time	Cycle
Pre-denaturation	95	10 min	1
denaturation	94	1 min	35
annealing	59	1 min	
elongation	72	2 min	
final elongation	72	7 min	1



การตรวจ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

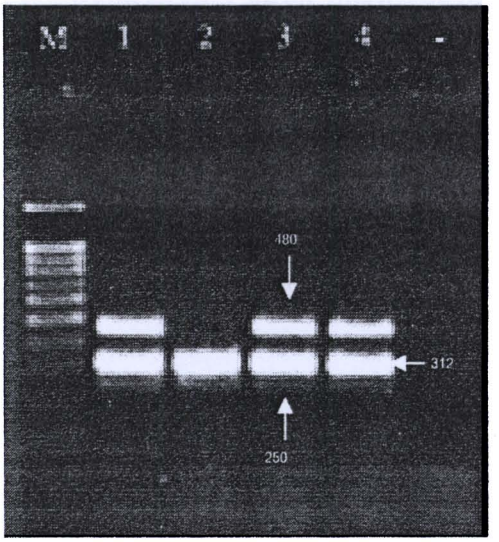
1) เตรียม agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ละลายใน 1X TAE buffer นำไปละลายใน microwave จนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันตั้งวุ้นให้เย็นลงแล้วเทใส่ถาดสำหรับ electrophoresis รอจน

วุ้นแข็งตัวดี จากนั้นนำถาดวุ้นไปวางใน electrophoresis chamber เติม 1X TAE buffer ลงไปใน chamber ให้ท่วมแผ่นวุ้น

2) นำ PCR product ที่ได้จำนวน 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye จำนวน 3 ไมโครลิตร นำส่วนผสมดังกล่าวเติมลงในหลุมของวุ้น จากนั้นเติม 100 bp DNA marker 1 หลุม ควบคู่ไปด้วยเสมอ เพื่อใช้ในการประมาณขนาดของ PCR product

3) ปิดฝา chamber แล้วเปิด power supply โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลท์ ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวกใช้เวลาประมาณ 30 นาที

4) เมื่อครบเวลาปิด power supply นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 20-25 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1 นาที นำไปตรวจดู DNA band ภายใต้แสง UV ขนาดของ PCR product คือ 480, 312 และ 250 bp สำหรับ GSTT1, CYP1A1 และ GSTM1 ตามลำดับ (รูปที่1) โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker และถ่ายภาพไว้เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป



รูปที่1 แสดงขนาดของ PCR product คือ 480, 312 และ 250 bp สำหรับ GSTT1, CYP1A1 และ GSTM1 ตามลำดับ

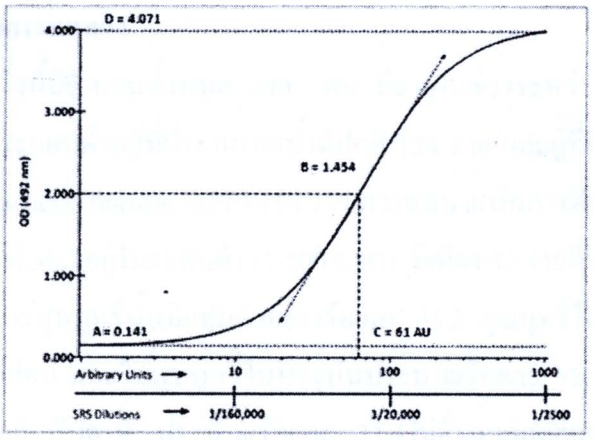
2.4 การตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

ทำ chequerboard titration เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี ELISA เพื่อทำการตรวจวัดระดับ IgG ต่อ *O. viverrini* (arbitrary unit) ได้แก่ optimal concentration ของ crude somatic *O. viverrini* antigenในการเคลือบ plate คือ 1 ug/ml, starting dilution ของ standard curve คือ 1:2500, optimal dilution ของ HRP anti-Human IgG คือ 1:8,000 และ optimal urine dilution ของซีรัม คือ 1:6,000

A

Assignment of arbitrary unit		
Dilution	Log dilution	AU
1:2500	-3.40	1000.00
1:5000	-3.70	500.00
1:10000	-4.00	250.00
1:20000	-4.30	125.00
1:40000	-4.60	62.50
1:80000	-4.90	31.25
1:160000	-5.20	15.62
1:320000	-5.51	7.81
1:640000	-5.81	3.90
1:1280000	-6.11	1.95

B



รูปที่ 2 ตารางแสดงระดับแอนติบอดี ของ standard reference serum ในแต่ละการเจือจาง และกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัม

1. เคลือบ 96-well flat bottom plate ด้วย crude somatic *Opisthorchis viverrini* antigen ความเข้มข้น 1 ug/ml ที่ละลายอยู่ใน phosphate buffered saline pH 7.4 หลุมละ 100 ul เก็บ plateไว้ที่ 4 °C ข้ามคืน
2. ล้าง plate ด้วย washing solution (0.05%Tween 20 in PBS) 5 ครั้งๆละ 3 นาที
3. block ด้วย blocking buffer(5% bovine serum albumin in PBS) หลุมละ 200 ul นาน 1 ชั่วโมง
4. ล้าง plate ด้วย washing solution 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที
5. เติม standard reference serum ที่เจือจาง 1:2500 และทำการเจือจางแบบ two fold จำนวน 11 จุด
6. เติมตัวอย่างซีรัมที่เจือจาง 1:6000 จำนวนหลุมละ100 ul แล้วเก็บ plate ไว้ที่ 4 °C ข้ามคืน
7. ล้าง plate ด้วย washing solution 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที
8. เติม Goat anti-human IgG-HRP 1:1800 หลุมละ 100 ul เก็บ plate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง
9. ล้าง plate ด้วย washing solution 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที
10. เติม OPD-substrate solution หลุมละ 100 ul เก็บ plate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
11. หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 N H_2SO_4 หลุมละ50 ul
12. วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 492 nm

สำหรับการคำนวณหา arbitrary unit ของแอนติบอดีนั้น เราสามารถทำการคำนวณ ได้โดยตรง โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงหรือ OD492 nm ของตัวอย่างเทียบกับจากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 2) ซึ่งระดับแอนติบอดีคำนวณได้จากสมการ $OD = d + (a - d)/[1 + (dilution/c)^b]$ (Plikaytis et al., 1991).