บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ศูนย์สวนดอกอณูพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1.microcentrifuge tube ขนาด 0.2 , 0.5 และ 1.5 ml

2.ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ

3.Micropipette

4.ถุงมือ

5.บีกเกอร์ (Beaker)

6.กระบอกตวง

7. forcep

8. เครื่องชั่งสาร

9.ถาดสำหรับการย้อมเจล

10.Hot plate stirrer ยี่ห้อ Digilog

11.เครื่องเขย่า (Shaker) ยี่ห้อ Thermo Electron Corporation

12.เครื่องเขย่าวน (Vortex) ยี่ห้อ Labnet

13.เครื่องอบแห้งเจล (Gel dryer) ยี่ห้อ Eutech instruments

14.Electrophoresis set ยี่ห้อ Bio Rad รุ่น Power Pac Basic

15.Water bath / Heat block ยี่ห้อ Labnet

16.เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Centronix

17.เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิหลอดทดลอง (thermalcycler) ยี่ห้อ LongGene

18. กระดาษปอนด์ 100 แกรม

19.นาฬิกาจับเวลา

สารเคมีในการทดลอง (ภาคผนวก ข)

1. น้ำกลั่น
2. ตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดผู้ชาย
3. ตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดผู้หญิง
4. ตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดจากผู้เสียหายที่ถูกกระทำชำเรา

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง

1. Proteinase K
2. Chelex

สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

1. 10X Taq buffer
2. dNTPs
3. Taq DNA polymerase
4. Sterile water
5. Primer mix DYS 393
6. DNA Template

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจล

1. Acrylamide solution
2. 87 % Glycerol

3. 10X buffer
4. AMPDS (Ammonium peroxodisulfate)
5. Tetramethylethylene-diamine (TMEDA or TEMED)

สารเคมีที่ใช้ในการย้อมเจล

1. Nitric acid
2. Silver nitrate
3. Sodium carbonate
4. Formalin
5. Glacial acetic acid

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

1.1 การกำหนดขนาดตัวอย่าง

จะคำนวณขนาดตัวอย่างตามวิธีการคำนวณเพื่อการเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างประชากร 2 กลุ่มที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน (อรุณ จิรวัฒน์กุล, 2547) สมการที่ใช้ในการคำนวณคือ

$$N = \frac{\left[Z_{\propto}\sqrt{\frac{b}{c}+1} + Z_{\beta}\sqrt{\left(\frac{b}{c}+1\right) - p\left(\frac{b}{c}-1\right)^2}\right]^2}{p\left(\frac{b}{c}-1\right)^2}$$

N : จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยทั้งหมด

a, b, c, d : เป็นค่าจากตาราง case control study ในงานวิจัยอ้างอิง

n : จำนวนตัวอย่างจากตาราง case control study ในงานวิจัยอ้างอิง

p : $\frac{b}{n}$ หรือ $\frac{c}{n}$ ที่มีค่าน้อย

α : ค่าความเชื่อมั่น ที่ 95 % = 0.05

β : ค่า power of test ที่ 90 % = 0.1

Z_α : ค่า standard score ของ $\alpha = Z_{0.05} = 1.96$

Z_β : ค่า standard score ของ $\beta = Z_{0.01} = 1.28$

ซึ่งในการคำนวณตามสมการดังกล่าวได้ใช้งานวิจัยของ Chomont et al. อ้างอิง ในการเปรียบเทียบระหว่างการตรวจ PSA ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของการพบน้ำอสุจิ กับ DNA ของ SRY gene สามารถทำเป็นตาราง case control study ได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบระหว่างการตรวจ PSA กับ ดีเอ็นเอของ SRY gene

		DNA		Total
		+	-	
PSA	+	**50 (a)**	**0 (b)**	50
	-	**50 (c)**	**164 (d)**	214
Total		100	164	**264 (n)**

เมื่อนำค่าในตารางที่ 1. มาแทนในสูตรการคำนวณจะได้ดังนี้

$$N = \frac{\left[1.96\sqrt{\frac{0}{50}+1} + 1.28\sqrt{\left(\frac{0}{50}+1\right) - \frac{50}{264}\left(\frac{0}{50}-1\right)^2}\right]^2}{\frac{50}{264}\left(\frac{0}{50}-1\right)^2}$$

N = 51.24

สำหรับงานวิจัยนี้จะต้องทำการทดลองในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 52 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบระหว่างการตรวจหาตัวอสุจิและ Y-chromosome DNA microsatellite ตำแหน่ง DYS 393 จึงได้คัดเลือกตัวอย่างที่ตรวจพบตัวอสุจิจำนวน 30 ตัวอย่างและตรวจไม่พบตัวอสุจิจำนวน 30 ตัวอย่าง (รายละเอียดของตัวอย่างน้ำซับช่องจากผู้เสียหายทั้งหมดได้แสดงไว้ในภาคผนวก ค) รวมทั้งหมด 60 ตัวอย่าง

1.2 การคัดเลือกตัวอย่าง

- คัดเลือกตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดจากผู้เสียหายที่มาตรวจที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างช่วงวันที่ 1 มกราคม 2550 – 31 ธันวาคม 2551 เป็นระยะเวลานาน 2 ปี โดยมีเงื่อนไขว่าผู้เสียหายจะต้องถูกกระทำชำเรามาไม่เกิน 48 ชั่วโมงและมีประวัติว่าผู้กระทำไม่ได้ใส่ถุงยางอนามัยขณะกระทำชำเรา

- ตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการค้นคว้าจะคัดเฉพาะตัวอย่างที่ตรวจสาร acid phosphatase ให้ผลบวกเท่านั้น (color test < 60 sec หรือปริมาณ > 300 U/ml หรือตรวจพบตัวอสุจิ) ทั้งนี้ก็เพื่อเพิ่มความมั่นใจว่าตัวอย่างจากน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหายที่ได้เลือกมาทำการค้นคว้านั้นมีโอกาส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผ่านการถูกกระทำชำเรามาจริงโดยจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ตรวจพบตัวอสุจิจำนวน 30 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบตัวอสุจิจำนวน 30 ตัวอย่าง

2. การสร้างอัลลีลมาตรฐาน (Allelic ladders)

1.ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ชายที่ทราบลักษณะทางพันธุกรรมในตำแหน่ง DYS393 จำนวน 4 ราย เป็นตัวกำหนดชนิดของอัลลีลที่ 12, อัลลีลที่ 13, อัลลีลที่14 และอัลลีลที่ 15 ดังที่แสดงข้อมูลไว้ในในภาคผนวก ง

2.นำตัวอย่างดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) มาทำการเพิ่มปริมาณโดยเตรียมส่วนผสม PCR mixture ลงใน PCR tube ขนาด 0.5 ml ดังนี้ น้ำยา Master mix 9.0 µl (ประกอบไปด้วย 10X buffer, dNTPs, Taq DNA-polymerase, Sterile water และ primer mix DYS 393, ภาคผนวก ข), DNA template (ตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดผู้ชายที่ทราบชนิดของอัลลีล) 1.0 µl

3.เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้โปรแกรมที่มีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังนี้

Denaturation	94 °C นาน	45 วินาที
Annealing	55 °C นาน	30 วินาที
Extension	72 °C นาน	30 วินาที

หลังจากนั้นปล่อยให้เครื่องทำงานไปจนครบ 35 รอบ แล้วพักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72° C นาน 7 นาที

4.นำผลผลิต PCR หรือ PCR product ที่ได้ไปแยกแถบดีเอ็นเอเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานโดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 volt วิ่งผ่าน Running buffer นาน 16.5 ชั่วโมง (990 นาที)

5.ย้อมเจลด้วยเทคนิค Silver staining จนเกิดแถบดีเอ็นเอชัดเจน

6.ตัดเจลแต่ละตำแหน่งที่เกิดแถบดีเอ็นเอในช่วงขนาด 100-140 คู่เบสใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ปริมาตร 1 ml. โดยใส่หลอดละหนึ่งตำแหน่ง (หรือ 1 แถบของดีเอ็นเอ) จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันบดเจลให้ละเอียด

7.นำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2-3 นาที

8.ดูดเอาน้ำส่วนบนทิ้งให้มากที่สุด แต่อย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหายไป

9.เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml ลงไปในหลอด นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที

นาน 2-3 นาที แล้วดูดน้ำส่วนบนทิ้งไป (ทำซ้ำ 2 รอบ)

10.เติม Proteinase K (10 mg./ml.) ปริมาตร 2 µl ลงไปในหลอด

11.เติมสารละลายแขวนลอย 5% Chelex ปริมาตร 200 µl แล้วนำไปปั่น(Vortex) ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปแช่อบที่อุณหภูมิ 60 ° C เป็นเวลา 60 นาที

12.นำไปปั่น(Vortex) ประมาณ 5-10 วินาทีแล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที

13.จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับบวนการ PCR (ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 2-8 ° C หรือ แช่แข็งก็ได้)

3.วิธีการตรวจ microsatellite DNA

3.1 ลักษณะตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่สกัดได้จากน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหายหรือ vaginal swab extract ที่ทำการตรวจหาตัวอสุจิและสาร acid phosphatase แล้วเก็บไว้ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก (eppendorf) รักษาไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจะสกัดโดยวิธี Total extraction

-ตัดบางส่วนของ swab เป็น 3 ส่วน ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่น 1 ml (ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที)

-ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ย cell ให้หลุดออกจาก swab ให้มากที่สุด ประมาณ 2 ml

-แยกเศษ swab ออกมาเก็บ (เผื่อสกัดซ้ำ)

-ปั่นแยกด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm (รอบต่อวินาที) นาน 2 นาที

-ดูดน้ำด้านบนบางส่วนทิ้งไป เหลือตะกอนและน้ำไว้ประมาณ 50 µl

-ใส่น้ำกลั่น 1 ml ลงใน tube อีกครั้ง แล้ว vortex ให้เข้ากันแล้วปั่นแยกจากนั้นดูดน้ำด้านบนบางส่วนทิ้งไป (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

-เติม proteinase K (10 mg/ml) ลงไปจำนวน 2 µl

-เติม 5% chelex 200 µl แล้ว vortex นาน 10 วินาที

-Incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

-นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที

-นำไป vortex นาน 10 นาที แบ่งปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 rpm (รอบ/นาที) นาน 8 นาที

-ได้ DNA template ของ sperm และ vaginal cell

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

กระบวนการ PCR จะทำใน PCR tube ขนาด 0.5 ml โดยใช้ส่วนผสม ดังนี้

- Master mix (water, 10X, dNTPs, DNA-polymerase, primer mix DYS 393) ปริมาณของส่วนผสมต่างๆที่อยู่ใน master mix แสดงในภาคผนวก ข

- DNA template (ตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากสำลีป้ายช่องคลอด)

วิธีการคือ

1.ใส่ Master mix จำนวน 6 µl และ DNA template จำนวน 4 µl ลงไปใน PCR tube ขนาด 0.5 ml

2.นำแต่ละหลอดไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ของผสมในหลอดถูกเหวี่ยงลงมาอยู่ก้นหลอด

3.นำเข้าเครื่อง Thermalcycler เปิดเครื่องให้มีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิตามโปรแกรมที่ตั้งไว้คือ

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 °C	นาน 45 วินาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 °C	นาน 30 วินาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 °C	นาน 30 วินาที

ทำทั้ง 3 ขั้นตอนรวมทั้งสิ้น 35 รอบและจากนั้นให้ hold ต่อที่ 72 °C นาน 7 นาที ก็จะได้ PCR products ของดีเอ็นเอจากน้ำสกัด Vaginal swab

5. การแยกแถบดีเอนเอในวุ้นโดยผ่านกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis)

โดยใช้ polyacrylamide gel 8.5% ซึ่งจะมีวิธีการเตรียมส่วนผสมดังตาราง

ตาราง 2 ส่วนผสมในการเตรียม polyacrylamide gel 8.5%

ส่วนผสม	37 ml.
H2O	21.26 ml
10X buffer	3.7 ml
Acrylamide	9.3 ml
87% Glyceral	2.55 ml
10% AMPDS	191 µl
TMEDA	14 µl

-เมื่อเตรียมเจลเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงเทลงไปในชุดกระจกสำหรับเตรียมเจลจากนั้นใส่หวีสำหรับสร้างหลุมลงไปด้านบนของชุดกระจกเตรียมเจล ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงให้เจลแข็งตัวจึงสามารถใช้ในการแยกแถบดีเอ็นเอได้ต่อไป

-เมื่อเจลแข็งตัวให้เอาหวีสำหรับสร้างหลุมในการโหลดเจลออก ฉีดล้างฟองอากาศระหว่างหลุมเจลออกให้หมดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นใส่ชุดกระจกที่เตรียมเจลลงไปในแทงค์ของเครื่อง gel electrophoresis แล้วใส่ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลงไป ซึ่ง 1 เจลจะสามารถใส่ได้ 25 หลุมโดยการใส่ตัวอย่างนั้นจะต้องผสมสีหรือ loading dye ลงไป (ภาคผนวก ข) เพื่อไม่ให้เกิด

การฟุ้งกระจายของ DNA เวลาที่ใส่ลงไปในหลุมและยังช่วยให้มองเห็น PCR product ที่ใส่ลงไปในหลุมด้วย ซึ่งวิธีการโหลดเจล (สำหรับ 1 เจล) มีรายละเอียด ดังนี้

1.ใส่ loading dye ลงไปใน PCR product (ที่ได้จากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหาย, ตัวอย่างจากเลือดผู้ชาย, ตัวอย่างจากเลือดผู้หญิงและอัลลีลมาตราฐาน) ปริมาณ 1 µl/tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงประมาณ 30 วินาที

2.ใส่ PCR product ที่ผสม loading dye ลงไปในหลุมตัวอย่างละ 8 µl โดยทุกครั้งของการโหลดเจลจะมี protocol ดังนี้

-หลุมแรกและหลุมสุดท้าย ใส่ตัวอย่างเลือดของผู้ชาย (positive control)

-หลุมที่ 2 ใส่ตัวอย่างเลือดของผู้หญิง (negative control)

-หลุมที่ 3 ใส่อัลลีลมาตราฐาน (allelic ladder)

-หลุมที่ 4 เป็นต้นไป ใส่ตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหายจำนวน 10 ตัวอย่าง แล้วคั่นด้วยการใส่อัลลีลมาตราฐานลงไป 1 หลุม

-หลุมที่เหลือใส่ตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหายลงไป (อีก 10 ตัวอย่าง) จากนั้นทำการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

-การแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้าในตัวกลางที่เป็นวุ้น จะทำการแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 volt นาน 16.5 ชั่วโมง

6.ขั้นตอนการย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining สำหรับ 1 เจล (วิฑูรย์และธานินทร์, 2005)

1.5.1 เติม 1% nitric acid (3 ml 65% nitric acid + น้ำกลั่น 200 ml) แช่ย่า 10 นาทีแล้วเททิ้ง

1.5.2 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5-10 วินาทีแล้วเททิ้ง ทำ 2 ครั้ง

1.5.3 เติม 0.012 M silver nitrate solution (0.4 g silver nitrate + น้ำกลั่น 200 ml) เขย่า 20 นาทีแล้วเททิ้ง

1.5.4 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5-10 วินาทีแล้วเททิ้ง ทำ 2 ครั้ง

1.5.5 เติม 0.2 M sodium carbonate และ 0.019% formalin (11.8 g sodium carbonate + น้ำกลั่น 390 ml แล้วเติม 37% formalin 205 ml) ลงไปประมาณ 50 ml เมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลให้เททิ้งและเติมส่วนที่เหลือลงไปเขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอบนเจลชัดเจน

1.5.6 หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% gracial acetic acid (20 ml 100% glacial acetic acid + น้ำกลั่น 180 ml) เขย่านาน 5 นาที

1.5.7 ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 200 ml นาน 1 นาที ประมาณ 3 ครั้งหรือจนหมดกลิ่นของ acetic acid

1.5.8 นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer

7.ขั้นตอนการอ่านและแปลผล

เมื่อทำการแห้งเจลเรียบร้อยแล้ว จะทำการอ่านผลโดยการอ่านแถบดีเอ็นเอเทียบกับอัลลีลมาตราฐานของแต่ละตำแหน่ง โดยการทำ PCR ทั้ง 60 ตัวอย่างแล้วอ่านผลจากเจลที่ได้หากมีแถบดีเอ็นเอที่ตรงอยู่ในช่วงเดียวกันกับแถบของอัลลีลมาตราฐาน (ladder) ก็จะถือว่าผลเป็น positive และในการทดลองนี้จะทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วแปลผลจาก 2 ใน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปคำนวณค่าทางสถิติ โดยการอ่านและแปลผลจะทำการตรวจทานโดยอาจารย์แพทย์ ผู้ควบคุมก่อนการพิมพ์รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทุกครั้ง