

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ microsatellites บนโครโมโซม Y ประกอบด้วยประชากรชายชาวไทยภูเขา 2 เผ่า คือ เผ่าเย้า บ้านแม่ซ้าย ตำบลแม่ยาว อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย และเผ่าลาหู่ บ้านท่าก้อซ้อ หมู่ 11 ตำบลแม่ข้าวต้ม อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสอบถามประวัติหมู่บ้านพบว่า เผ่าเย้าบ้านแม่ซ้าย อพยพมาจากบ้านขุนบง อำเภอพญาเม็งราย จังหวัดเชียงรายเมื่อ 50 ปีที่ผ่านมา และในเผ่าลาหู่ที่บ้านก้อซ้อ อพยพมาจาก บ้านป่าบง อำเภอแม่จัน และบ้านหัวแม่คำ อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย เมื่อ 21 ปีที่ผ่านมา ส่วนใหญ่ผสมผสานกับชาวจีนฮ่อและมีประชากรชาวลาหู่ 107 หลังคาเรือน จำนวน 814 คน

การเก็บตัวอย่างเลือด (peripheral blood) เก็บจากเพศชายวัยเจริญพันธุ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับเครือญาติกัน (อายุระหว่าง 15-45 ปี) จากชาวไทยภูเขาทั้ง 2 เผ่า คือ เผ่าเย้าและเผ่าลาหู่ จำนวนเผ่าละ 15 คน โดยใช้เข็มฉีดยาซึ่งต่ออยู่กับกระบอกฉีดยา ขนาด 10 มล เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณข้อพับแขน ดูดเลือดประมาณ 5 มล ใส่ในหลอดที่มี ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 0.4 มล กลับหลอดไปมาให้เลือดกับ EDTA ผสมเข้ากันดี และทำสัญลักษณ์ของแต่ละหลอดตัวอย่างเพื่อให้ทราบถึงที่มา แล้วเก็บในที่เย็น

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดที่ได้จะถูกทำลายเม็ดเลือดแดง แล้วนำเม็ดเลือดขาวมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีอินออร์แกนิก โดยแยกโปรตีนออกด้วยเกลือความเข้มข้นสูงและตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยอัลกอฮอล์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. นำตัวอย่างเลือดที่เก็บได้มาเติม red cell lysis buffer (RCLB) 10 มล เขย่าไปมาเพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก
2. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์
3. ทำซ้ำข้อ 1 และ 2
4. ละลายตะกอนเซลล์ใน white cell lysis buffer (WCLB) 1.8 มล

5. แบ่งตะกอนเซลล์ที่ละลายแล้ว 900 ไมโครลิตร เติม proteinase k ความเข้มข้น 20 มก ต่อ มล ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
6. แช่ใน waterbath เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าบ้างเป็นครั้งคราว
7. เติมสารละลายเกลืออิมตัว (6M NaCl 300 ไมโครลิตร) เขย่าให้เข้ากัน แล้วปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
8. เก็บสารละลายชั้นบนแบ่งใส่หลอดใหม่ 2 หลอด หลอดละ 600 ไมโครลิตร แล้วเติมเอทานอล 99 % ที่เย็นจัด 1.2 มล ในแต่ละหลอด พลิกกลับไปกลับมาเบาๆจนเห็นสายดีเอ็นเอตกตะกอนออกมา
9. ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนไว้แล้วล้างตะกอนออกด้วยเอทานอล 70 % 1 มล ทั้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer 100-200 ไมโครลิตร
10. นำไปตรวจการดูดกลืนแสง UV ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วเทียบค่า OD ที่ได้เป็นค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ใช้หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดย OD₂₆₀ มีค่า 50 mg/ml

3. การเพิ่มขยายชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

1. ชนิดของ primer

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาขยายปริมาณ tetranucleotide repeat 4 ตำแหน่งบนโครโมโซม Y ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ดังต่อไปนี้

ตำแหน่ง	primer
DYS19	DYS19.1 (CTA CTG AGT TTC TGT TAT AGT)
(Roewer <i>et al.</i> , 1992)	DYS19.2 (ATG GCA TGT AGT GAG GAC A)
DYS385	DYS385.1 (AGC ATG GGT GAC AGA GCT)
(Jobling & Tyler-Smith, 1995)	DYS385.2 (GGG ATG CTA GGT AAA GCT G)
DYS389	DYS389.1 (CCA ACT CTC ATC TGT ATT ATC TAT G)
(Roewer <i>et al.</i> , 1996)	DYS389.2 (TCT TAT CTC CAC CCA CCA GA)
DYS393	DYS393.1 (GTC GTC TTC TAC TTG TGT CCA TAC)
(Roewer <i>et al.</i> , 1996)	DYS393.2 (AAC TCA AGT CCA AAA AAT GAG G)

2. วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ประกอบด้วยการเตรียมสารเพื่อทำปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองขนาด 0.5 มล สำหรับตำแหน่ง DYS19, DYS389 และ DYS393 ทำดังนี้

	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	-	30.8
10 X PCR buffer	1 X	5
25 mM MgCl ₂ solution	3.5 mM	7
10 mM dNTP	800 μM	4
20 μM each primer	0.4 μM	2
1 μg /μl DNA template	0.5 μg	0.5
1 U/μl Tag polymerase	0.7 U	0.7
	รวม	50

เติม mineral oil 1-2 หยด เพื่อป้องกันการระเหยของส่วนผสมขณะทำปฏิกิริยา

ส่วนที่ตำแหน่ง DYS385 ลดปริมาตรของ MgCl₂ solution เป็น 3 μl และใช้ 0.5 U/μl Tag polymerase แทนด้วยปริมาตร 2 μl แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตรเท่าเดิม

กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิของ Hybaid Ome-E โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ สำหรับตำแหน่ง DYS19 และ DYS393 ตามลำดับดังนี้

รอบที่ 1	95.0°C	10 นาที (เพื่อกระตุ้นเอนไซม์ Tag polymerase)
รอบที่ 2-34	94.0°C	1 นาที (denaturation)
	52.0°C	1 นาที (annealing)
	72.0°C	1 นาที (extension)
รอบที่ 35	72.0°C	7 นาที (เพื่อให้ปฏิกิริยาทำงานสมบูรณ์ยิ่งขึ้น)

ส่วนที่ตำแหน่ง DYS389 เปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง annealing เป็น 54.0°C และที่ตำแหน่ง DYS385 เปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง annealing เป็น 57.0°C

3. การตรวจสอบผลผลิต PCR

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ผง agarose 0.5 กรัม ละลายใน 1X TBE buffer 50 มล (1%) เทลงในแบบพิมพ์ เสียบหัวแล้วปล่อยให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นดึงหัวออก จะได้ช่องในแผ่นวุ้น (well)

เตรียมผลผลิต PCR ที่ต้องการจะตรวจสอบว่ากระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิได้ผลดีหรือไม่ ทำได้โดยผสม loading dye 1 ไมโครลิตร กับผลผลิต PCR จากข้อ 2 ที่แบ่งมา 8-10 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องของแผ่นวุ้นที่วางอยู่ในกล่อง buffer ที่ใส่ TBE buffer ใว้จนท่วมแผ่นวุ้น ต่อสายไฟระหว่างกล่อง buffer กับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 30 นาที แล้วนำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วย 1% ethidium bromide 15 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV

4. การหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว

นำผลผลิต PCR มาแยกขนาดหาความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่เพิ่มปริมาณแล้ว ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมสีแผ่นวุ้นด้วยสี silver

ผลผลิต PCR จากตำแหน่ง DYS19, DYS389 และ DYS393 จะสามารถทราบขนาดได้จากการทำ electrophoresis เทียบกับ DNA molecular weight marker 25 bp (Gibco BRL) ส่วนจากตำแหน่ง DYS385 ใช้เปรียบเทียบกับ DNA molecular weight marker 100 bp (Gibco BRL) โดยการวาดกราฟระยะทางที่ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ marker เคลื่อนที่ได้ (เซนติเมตร) กับค่า log ของขนาดดีเอ็นเอ marker (คู่เบส) บนกระดาษ semi-logarithmic graph (ดังแสดงในภาคผนวก ข) แล้วหาขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้นกับกราฟที่สร้างไว้ และนำไปประกอบกับหลักการที่ว่า ผลผลิต PCR จากไมโครแซทเทลไลต์ดังกล่าวเป็น tetranucleotide repeat ดังนั้นความผันแปรที่เกิดขึ้นจะเกิดขึ้นครั้งละ 4 คู่เบส

สำหรับการตรวจสอบตำแหน่ง DYS19, DYS389 และ DYS393 เตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 8 % จาก stock ของสารละลาย polyacrylamide เข้มข้น 40 % โดยผสมผง acrylamide 19 กรัม และ bis acrylamide 1 กรัม เข้าด้วยกัน นำมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและไอออน ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มล หลังจากนั้นเทสารละลายที่ผสมเข้ากันดีแล้วลงระหว่างแผ่นกระจกให้เต็ม แล้วเสียบหัว ทิ้งไว้ให้แผ่นวุ้นแข็งตัวประมาณ 2-3 ชั่วโมง ดึงหัวออก นำแผ่นวุ้นที่แข็งตัวดีแล้วประกอบเข้ากับ V16 Vertical Gel Electrophoresis Apparatus (Gibco BRL) เติม 1X TBE Buffer แล้วจึงหยอดผลผลิต PCR ประมาณ 5-7 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร ลงในช่องของแผ่นวุ้น ต่อวงจรไฟฟ้า ใช้กระแสไฟขนาด 80 โวลต์ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของผลผลิต ส่วนตำแหน่ง DYS385 ใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 % จาก stock ของสารละลาย polyacrylamide เข้มข้น 30 % โดยผสมผง acrylamide 29 กรัม และ bis acrylamide 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและไอออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล หลังจากนั้นใช้ syringe ดูดสารละลายทั้งหมดฉีดเข้าระหว่างแผ่นกระจกให้เต็ม แล้ว

เสียบหัว ทิ้งไว้ให้แผ่นวุ้นแข็งตัวประมาณ 2-3 ชั่วโมง คึงหัวออก นำแผ่นวุ้นที่แข็งตัวดีแล้ว ประกอบเข้ากับ SA-32 Sequencing Gel Electrophoresis system (Gibco BRL) หยอดผลผลิต PCR ประมาณ 3-5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร ต่อบังคับไฟฟ้า ใช้กระแสไฟขนาด 300 โวลต์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

การย้อมสีแผ่นวุ้นด้วย silver มีวิธีการดังนี้

1. นำแผ่นวุ้นออกจากกระจกด้วยความระมัดระวัง
2. แช่แผ่นวุ้นในเอทานอล 10 % เป็นเวลา 10 นาที
3. ย้ายแผ่นวุ้นลงแช่ในกรดไนตริก 1 % เป็นเวลา 10 นาที
4. ล้างแผ่นวุ้นด้วยน้ำกลั่นประมาณ 5 วินาที
5. แช่แผ่นวุ้นในสารละลาย silver nitrate 0.012 M นาน 35 นาที
6. ล้างแผ่นวุ้นด้วยน้ำกลั่นประมาณ 5 วินาที
7. แช่แผ่นวุ้นในสารละลายที่มี sodium carbonate 0.28 M และ formalin 0.019 % อัตราส่วน 1 : 1 เมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำน้ำตาล จึงเททิ้งแล้วเทสารละลายผสมลงไปใหม่ ทำหลายครั้งจนเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน
8. แช่แผ่นวุ้นลงในกรดอะซิติก 10 % เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา
9. แช่แผ่นวุ้นลงในน้ำกลั่นเพื่อล้างกรดอะซิติกออก
10. นำแผ่นวุ้นไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Gel dryer

5. การหาความถี่อัลลีล

เมื่อได้ข้อมูลขนาดของผลผลิต PCR ซึ่งก็คือแต่ละอัลลีลที่ตำแหน่งต่างๆแล้ว นำมาหาความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งได้โดย

$$p_i = \frac{n_i}{N_i}$$

p_i คือ ความถี่ของอัลลีล i

n_i คือ จำนวนของอัลลีล i ในประชากร

N_i คือ จำนวนประชากรที่ศึกษา (เท่ากับจำนวนโครโมโซม Y ที่ศึกษา)

ในกรณีที่อัลลีล i เป็น duplicated allele ค่า N_i จะเท่ากับจำนวน $Y \times 2$

6. การคำนวณหาความหลากหลายทางพันธุกรรม

6.1 การวัดความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในเผ่าเดียวกัน ทำโดยวัดค่าต่อไปนี้

- 1) allelic diversity ของแต่ละตำแหน่ง
- 2) ค่าเฉลี่ยของ allelic diversity
- 3) haplotype diversity

1) allelic diversity เมื่อพิจารณาไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง (D_A)

$$D_A = 1 - \left[\frac{N_A}{N_A - 1} (\sum p_i^2) \right]$$

D_A คือ ค่า allelic diversity (Perez-lezaun *et al.*, 1999) ของตำแหน่ง A

N_A คือ จำนวนประชากรที่ศึกษา

p_i คือ ความถี่ของอัลลีล i

2) ค่าเฉลี่ยของ allelic diversity ($\bar{D}$)

$$\bar{D} = \frac{\sum D}{r}$$

$\sum D$ คือ ผลรวมของ allelic diversity ของแต่ละตำแหน่ง

r คือ จำนวนตำแหน่งที่ศึกษา

3) haplotype diversity (D_h)

$$D_h = 1 - \left[\frac{N_h}{N_h - 1} (\sum p_i^2) \right]$$

D_h คือ ค่า haplotype diversity (Perez-lezaun *et al.*, 1999)

N_h คือ จำนวนประชากรที่ศึกษา

p_i คือ ความถี่ของแฮปโลไทป์ i

6.2 การวัดระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งสองเผ่า (genetic distance) ประเมินด้วย

- 1) genetic distance ของแต่ละตำแหน่ง
- 2) genetic distance จากทุกตำแหน่ง
- 3) haplotype distance

1) genetic distance ของแต่ละตำแหน่ง (D_L)

$$D_L = -\ln \left[\frac{G_{xy}}{\sqrt{G_x G_y}} \right]$$

D_L = genetic distance ระหว่างประชากร X และ Y พิจารณาที่ตำแหน่ง L
(Nei, 1978)

$$G_{xy} = \sum p_i q_i$$

$$G_x = \sum p_i^2$$

$$G_y = \sum q_i^2$$

p_i = ความถี่ของอัลลีล i ในประชากร X

q_i = ความถี่ของอัลลีล i ในประชากร Y

2) genetic distance จากทุกตำแหน่ง (D_T)

$$D_T = -\ln \left[\frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}} \right]$$

D_T = genetic distance จากทุกตำแหน่ง (Nei, 1978)

$$J_x = \text{ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของ } G_x (\sum p_i^2)$$

$$J_y = \text{ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของ } G_y (\sum q_i^2)$$

$$J_{xy} = \text{ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ของ } G_{xy} (\sum p_i q_i)$$

3) haplotype distance (D_H)

$$D_H = -\ln \left[\frac{G_{xy}}{\sqrt{G_x G_y}} \right]$$

D_H = haplotype distance ระหว่างประชากร X และ Y (Nei, 1978)

$$G_{xy} = \sum p_i q_i$$

$$G_x = \sum p_i^2$$

$$G_y = \sum q_i^2$$

p_i = ความถี่ของ haplotype i ในประชากร X

q_i = ความถี่ของ haplotype i ในประชากร Y

7. การเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากร

ใช้ χ^2 contingency test statistics เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากร ตามสมการ

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{observed} - \text{expected})^2}{\text{expected}}$$

โดย

		C1	C2	C3	
R1	Obs	...	...	...	R1T
	Exp	(R1TxC1T)/T	(R1TxC2T)/T	(R1TxC3T)/T	
R2	Obs	...	...	...	R2T
	Exp	(R2TxC3T)/T	(R2TxC3T)/T	(R2TxC3T)/T	
		C1T	C2T	C3T	CiT / RiT

RiT คือ ผลรวมของแถว R ที่ i

CiT คือ ผลรวมของคอลัมน์ C ที่ i

T คือ ผลรวมของแถว RiT หรือ CiT

ค่า degree of freedom (df) = (R-1)(C-1)