บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์การวิจัย

เครื่องมือ

- Autoclave [ES-315, Tomy]
- Automatic pipette ขนาด 10, 50, 100, 1,000 µL [Biohit/Gilson]
- Centrifuge [1010D, Centurion scientific]
- Electrophoresis [Mupid-exu, Advance]
- Hot air oven [ULM 100-800, Memmert]
- Microwave [M181GN, Samsung]
- PCR machine [PCR system 2400, Perkin elemer]
- pH meter [500pH, Cyberscan]
- Refrigerator [SJ-48G, Sharp]
- Spectrophotometer [U2001, Hitachi]
- Spin down [CM-610T, Hsiangtai]
- Vortex [G-560E, Scientific industries]
- Waterbath [PFV-2, Precitherm]

อุปกรณ์

- Aluminium foil [Diamond]
- Bubble bulb
- Microcentrifuge tube ขนาด 0.6 และ 1.5 mL [Axygen]
- Parafilm [Pechiney]
- PCR tube ขนาด 0.2 mL [Axygen]
- Pipette tip [Axygen]
- Stop watch [Taksun]

เครื่องแก้ว

- Beaker ขนาด 100, 200, 500 mL [Pyrex]
- Cylinder ขนาด 100, 500, 1,000 mL [Simax kavalier stabil]
- Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250, 500, 1,000 mL [Pyrex]
- Serological pipette ขนาด 1, 5, 10 mL [HBG]
- Stirring rod
- Test tube ขนาด 12x75 mL [Pyrex]
- Thermometer
- Volumetric flask ขนาด 100, 500 mL [Schott duran]

สารเคมี

- Absolute ethanol [Merck]
- Agarose [Vivantis]
- 10X $(NH_4)_2SO_4$ buffer [fermentas]
- 100 base pair DNA marker [Vivantis]
- Buffer BB [Vivantis]
- Boric acid [BDH]
- Dde I [New england biolabs]
- 100 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) [Vivantis]
- Ethidium bromide [Vivantis]
- Ethylene diamine tetraacetic acid dipotassium salt dihydrate (EDTA●$2H_2O$) [BDH Chemical]
- Fnu4HI [New england biolabs]
- Hydrochloric acid (HCl) [Merck]
- 6X loading dye [Vivantis]
- Magnesium chloride ($MgCl_2$) [fermentas]
- Primers [1st Base]
- Proteinase K [Vivantis]

- S buffer [Vivantis]
- Sodium hydroxide (NaOH) [Merck]
- Taq polymerase [Fermentas /Vivantis]
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane [Vivantis]
- Wash Buffer 1 [Vivantis]
- Wash Buffer 2 [Vivantis]

3.2 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลือกกลุ่มประชากรแบบสุ่ม จากประชากรไทยที่เข้ารับบริการตรวจสุขภาพประจำปี ณ สถานเวชศาสตร์ชันสูตร คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ไม่เป็นโรคตับ โรคไทรอยด์ โรคมะเร็ง หรือได้รับยาลดไขมัน และไม่รวมสตรีที่อยู่ในระหว่างมีครรภ์หรือให้นมบุตรจำนวน 204 ราย ที่ผ่านการตอบแบบสอบถาม/สัมภาษณ์ประวัติ และการตรวจร่างกายโดยแพทย์ ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดได้รับความยินยอมจากอาสาสมัครที่ได้รับการอธิบายถึงรายละเอียดการทดลองและมีการลงชื่อยินยอม

3.3 ตัวอย่าง (sample)

เก็บตัวอย่างเลือดครบส่วน โดยใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งจำนวน 0.2 mL เพื่อใช้ในการสกัด DNA ซึ่งตัวอย่างเลือดถูกเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัด DNA และเก็บตัวอย่างเลือดใส่ในหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งจำนวน 3 mL ตั้งทิ้งไว้ให้ clot ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นแยกซีรั่มด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (round per minute; rpm) เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อตรวจค่าสารชีวเคมี จากอาสาสมัครที่งดอาหารแล้วอย่างน้อย 12 ชั่วโมง

3.4 การตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมี

การตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีทำโดยใช้ซีรั่ม จำนวน 1.5 mL โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ auto analyzer (Hitachi 917) [Roche diagnostic] โดยสถานเวชศาสตร์ชันสูตร คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.5 วิธีการศึกษาการกระจายตัวของ DNA polymorphisms ของยีนพาราออกโซเนส 2 ในกลุ่มตัวอย่างประชากรไทยด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphisms (RFLP)

การศึกษาการกระจายตัวของ DNA polymorphisms ของยีน *PON2* ที่ตำแหน่ง 148 (A148G) และ 311 (C311S) โดยเทคนิค restriction fragment length polymorphisms (RFLP) ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ การสกัด DNA (extract DNA) จากเลือดครบส่วน แล้วนำ DNA ที่ได้เป็น DNA ตั้งต้นในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *PON2* ด้วยวิธี PCR จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และทำการตรวจสอบชิ้นส่วน DNA (DNA fragment) ที่พบหลังทำการตัดด้วยเอนไซม์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่ออ่าน genotype ของยีน จากนั้นนำผลของความถี่ของแต่ละ genotype ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

3.5.1. การสกัด DNA จากเลือดครบส่วน ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GF-1 blood DNA extraction kit

หลักการ

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GF-1 blood DNA extraction kit [Vivantis] เป็นการสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวในเลือดครบส่วน โดยอาศัยหลักการ solid-phase isolation หรือ spin column โดยขั้นตอนในการสกัด DNA เริ่มจากการทำให้เซลล์แตก (cell lysis) โดย BB buffer จากนั้นเติม proteinase K แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเพื่อย่อย nuclei pellet เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม absolute ethanol ที่อุณหภูมิห้องเพื่อตกตะกอน DNA แล้วเท sample ใส่ลง spin column ซึ่งมีกระดาษกรองที่มีลักษณะเป็น special glass microfiber ที่มีความเป็นประจุบวกสูงจับกันอย่างเหนียวแน่นกับ DNA ที่มีโครงสร้างเป็นประจุลบ ทำการล้างส่วนที่ไม่ใช่ DNA ออกเพื่อให้ได้ DNA ที่มีความบริสุทธิ์โดย wash buffer 1 และ wash buffer 2 ตามลำดับ แล้วทำการเติม

dH_20 autoclaved ที่ผ่านการ pre-incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เพื่อ elute DNA ออกจาก glass microfiber จากนั้นเก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

วิธีการสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GF-1 blood DNA extraction kit (50 preps)

วิธีการเตรียมน้ำยา

1. Wash buffer 1

เติม absolute ethanol ปริมาตร 15 mL ลงในขวด wash buffer 1

2. Wash buffer 2

เติม absolute ethanol ปริมาตร 40 mL ลงในขวด wash buffer 2

วิธีการสกัด DNA

1. นำ blood sample 200 µL ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2. เติม buffer BB (ที่ผ่านการ pre-incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) ปริมาตร 200 µL ใน tube blood sample แล้ว mix ให้เข้ากันแบบ pulsed-vortexing

3. เติม 20 mg/mL proteinase K ปริมาตร 20 µL ลงใน tube sample แล้ว mix ด้วยวิธี invert ทันที จากนั้นนำไป incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. เติม absolute ethanol 200 µL mix ด้วยวิธี invert ทันที

5. ดูดสารละลายในข้อ 4 ลงใน spin column จากนั้นนำไปปั่นด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดึง spin column ออกแล้วเทสารละลายที่อยู่ใน microcentrifuge tube ทิ้ง

6. เติม wash buffer 1 ปริมาตร 500 µL จากนั้นนำไปปั่นด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดึง spin column ออกแล้วเทสารละลายที่อยู่ใน microcentrifuge tube ทิ้ง

7. เติม wash buffer 2 ปริมาตร 500 µL จากนั้นนำไปปั่นด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดึง spin column ออกแล้วเทสารละลายที่อยู่ใน microcentrifuge tube ทิ้ง

8. เติม wash buffer 2 ปริมาตร 500 µL จากนั้นนำไปปั่นด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดึง spin column ออกและทิ้ง microcentrifuge tube

9. ย้าย spin column ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ จากนั้นเติม dH_2O autoclaved ที่ผ่านการ pre-incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปริมาตร 50 µL ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

10. เติม dH_2O autoclaved ที่ผ่านการ pre-incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปริมาตร 50 µL ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำ spin column ทิ้งและเก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ของยีน *PON2* โดยวิธี PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ polymorphisms ที่ตำแหน่ง A148G และ C311S

หลักการ

PCR เป็นวิธีการสังเคราะห์ dsDNA ในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนในหลอดทดลองที่มี deoxy nucleotide triphosphate (dNTP) ในส่วนประกอบของสารละลายที่เหมาะสม โดยแต่ละลำดับของปฏิกิริยา PCR จะถูกควบคุมโดยเครื่อง PCR machine ซึ่งปฏิกิริยา PCR จะทำการสังเคราะห์ DNA บริเวณที่อยู่ระหว่าง oligonucleotide primer 2 สาย ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation, primer annealing และ extension ตามลำดับ

วิธีทำ

1. นำ primer ที่จำเพาะดังตารางที่ 2 สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 23930 ถึงตำแหน่ง 24060[(GenBank: AY210982.1)] ของ *PON2*-A148G และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 30062 ถึงตำแหน่ง 30266[(GenBank: AY210982.1)] ของ *PON2*-C311S โดยผสมส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาดังตาราง 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดง primer ของ *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S

Polymorphisms	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
PON2- A148G	AGTGGAAATTTTTAAATTTG AAGCAG	TTGTTTGCAAATGCTGGGGAT
PON2-C311S	CAACAGCATGTCCCCTTAATC	GGCTACAGAACTTCCTTGGAG

ตารางที่ 3 แสดงส่วนผสมของสารเคมีในการทำ PCR ของ *PON2*-A148G

สารเคมี	ปริมาตร (µL)
1. dH_2O	12.0
2. S buffer	3.0
3. Forward primer (10 pmole/µL)	2.5
4. Reverse primer (10 pmole/µL)	2.5
5. dNTPs (2 mmole)	2.0
6. Taq polymerase (5 U/µL)	0.3
7. DNA template	3.0

ตารางที่ 4 แสดงส่วนผสมของสารเคมีในการทำ PCR ของ *PON2*-C311S

สารเคมี	ปริมาตร (µL)
1. dH_2O	11.0
2. 10X $(NH_4)_2SO_4$ buffer	2.5
3. $MgCl_2$	1.3
4. Forward primer (50 pmole/µL)	2.0
5. Reverse primer (50 pmole/µL)	2.0
6. dNTPs (2 mmole)	2.0
7. *Taq* polymerase (5 U/µL)	0.3
8. DNA template	4.0

2. เพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เครื่อง PCR machine โดยอุณหภูมิและเวลาสำหรับกระบวนการต่างๆ ดังตารางที่ 5 สำหรับ *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S จากนั้นนำ PCR product เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP

ตารางที่ 5 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ของ *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S

ขั้นตอน	*PON2*-A148G	*PON2*-C311S	หมายเหตุ
Initial denaturation	94 °C, 4 นาที	94 °C, 5 นาที	แยก dsDNA เป็น ssDNA
Denaturation	94 °C, 50 วินาที	94 °C, 45 วินาที	เพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่งที่ต้องการศึกษา โดยทำซ้ำทั้งสิ้น 40 รอบ (Cycle)
Annealing	55 °C, 50 วินาที	55 °C, 50 วินาที	
Extension	72 °C, 50 วินาที	72 °C, 50 วินาที	
Final extension	72 °C, 7 นาที	72 °C, 10 นาที	ต่อสาย DNA เส้นใหม่อย่างสมบูรณ์

A148G primer จะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ตั้งแต่ตำแหน่ง 23930 ถึงตำแหน่ง 24059[(GenBank: AY210982.1)] ของ *PON2*-A148G ทำให้ได้ PCR product ขนาด 130 bp

C311S primer จะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ตั้งแต่ตำแหน่ง 30062 ถึงตำแหน่ง 30266[(GenBank: AY210982.1)] ของ *PON2*-C311S ทำให้ได้ PCR product ขนาด 205 bp

3.5.3 Restriction fragment length polymorphisms (RFLP)

หลักการ

เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของ DNA โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วน DNA หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หากเกิดการเปลี่ยนแปลง nucleotide ณ บริเวณที่เป็น recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะทำให้ไม่สามารถตัดสาย DNA ออกเป็นชิ้นส่วนขนาดต่างๆ ได้ โดยนำ PCR product ที่ผ่านการ digest ไปแยกขนาดโดยวิธี electrophoresis เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบชิ้นส่วน DNA (DNA banding pattern)

วิธีทำ

1. ผสมส่วนประกอบในการ digest ของ PCR product *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S ดังตารางที่ 6 แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 แสดงส่วนผสมของสารเคมีในการ digest PCR product *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S

สารเคมี	*PON2*-A148G	*PON2*-C311S
1. dH_2O	3.0 µL	3.0 µL
2. Buffer no.3	-	1.5 µL
3. Buffer no.4	1.5 µL	-
4. DdeI (10U/µL)	-	0.5 µL
5. Fnu4HI (5U/µL)	0.5 µL	-
6. PCR product	10.0 µL	10.0 µL

3.5.4 ขั้นตอนการตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

หลักการ

ทำการตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA โดยการทำ agarase gel electrophoresis อาศัยความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดต่างกันได้ในระยะทางแตกต่างกัน โดยผสม digested product 10 µl กับ 6X loading dye 2 µl นำมาแยกขนาดของ DNA fragment บน 2.5% agarose gel ใน 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer ด้วยความต้านทานไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการอ่าน genotype โดยการเทียบขนาดชิ้นส่วน DNA กับ DNA marker ขนาด 100 bp ใช้เครื่อง UV-trans-illuminator gel documentation โดยให้คนอย่างน้อย 2 คน แยกกันอ่านลักษณะชิ้นส่วน DNA ที่เกิดขึ้น โดย

ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ Fnu4HI อยู่ตรงกับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 148 ของยีน *PON2* ซึ่งเป็นสร้างกรดอะมิโนชนิด alanine (A) ทำให้สามารถตัดชิ้นส่วนที่ได้จาก PCR ออกเป็นขนาด 24 bp และ 106 bp

ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ DdeI อยู่ตรงกับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 311 ของยีน *PON2* ซึ่งเป็นสร้างกรดอะมิโนชนิด serine ทำให้สามารถตัดชิ้นส่วนที่ได้จาก PCR ออกเป็นขนาด 67 bp และ 138 bp

วิธีการเตรียมน้ำยา

1. เตรียม 0.5 M ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

นำ ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt 18.61 g ละลายด้วย dH_2O autoclaved ปริมาตร 80 mL เติม NaOH 2-3 เม็ด ละลายให้เข้ากัน ปรับค่า pH ให้ได้ 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วย dH_2O autoclaved

2. เตรียม 20X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer

ชั่ง tris base 54 g กับ boric acid 27.5 g นำมาละลายกับ dH_2O autoclaved ปริมาตร 400 mL เติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 20 mL และปรับปริมาตรเป็น 500 mL ด้วย dH_2O autoclaved

3. เตรียม 1X TBE buffer

เจือจาง 20X TBE buffer ปริมาตร 50 mL ด้วย dH_2O autoclaved ปริมาตร 950 mL

4. การเตรียม 2.5% agarose gel

ชั่ง agarose 3.75 g มาละลายกับ 1X TBE buffer 150 mL นำมาให้ความร้อนด้วย microwave ไฟปานกลางจนกว่า agarose ละลายจนใส เติม 10 mg/mL ethidium bromide ปริมาตร 3 µL จากนั้นเทสารละลายใส่ tray อย่าให้มีฟองอากาศ ถ้ามีฟองให้ใช้ comb ลากฟองที่มีให้มาอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของ tray ใส่ comb ลงบนสารละลายด้านบน tray เพื่อทำให้เกิดหลุม (well) รอให้สารละลายแข็งแล้วดึง comb ออก นำ 2.5% agarose gel ใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี 1X TBE buffer

วิธีทำ

1. ผสม digested PCR ปริมาตร 10 µL กับ 6X loading dye ปริมาตร 2 µL
2. ใส่สารละลายในข้อ 1 ลงใน well ของ 2.5% agarose gel
3. Run electrophoresis ด้วยความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที
4. นำแผ่น agarose ไปเข้าเครื่อง UV-trans-illuminator เพื่อดูแถบ DNA ของ digested PCR และถ่ายรูป gel เพื่อทำการอ่าน genotype ของ *PON2*-A148G และ *PON2*-C311S โดย

PON2-A148G ตัวอย่างที่มี G allele จะไม่ถูกเอนไซม์ Fnu4HI ตัด เมื่อนำไปทำ gel electrophoresis จะได้ชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาด 130 bp เท่านั้น ในขณะที่ตัวอย่างที่มี A allele จะถูกเอนไซม์ Fnu4HI ตัด ได้ชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 24 bp และ 106 bp ดังนั้น ตัวอย่างที่มี genotype เป็น

GG จะมีชิ้นส่วน DNA ขนาดเดียว คือ 130 bp เท่านั้น

AG จะมีชิ้นส่วน DNA 3 ขนาด คือ 24 bp, 106 bp และ 130 bp

AA จะมีชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 24 bp และ 106 bp

PON2-C311S ตัวอย่างที่มี C allele จะไม่ถูกเอนไซม์ DdeI ตัด เมื่อนำไปทำ gel electrophoresis จะได้ชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาด 205 bp เท่านั้น ในขณะที่ตัวอย่างที่มี S allele จะถูกเอนไซม์ DdeI ตัด ได้ชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 67 bp และ 138 bp ดังนั้น ตัวอย่างที่มี genotype เป็น

CC จะมีชิ้นส่วน DNA ขนาดเดียว คือ 205 bp เท่านั้น

CS จะมีชิ้นส่วน DNA 3 ขนาด คือ 67 bp, 138 bp และ 205 bp

SS จะมีชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 67 bp และ 138 bp

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ (statistical analysis)

นำผลการอ่าน genotype ของกลุ่มประชากรที่ศึกษามาทำการคำนวณหาความถี่การกระจายตัว (gene frequency) ของยีน *PON2* โดย Gene counting method และ Hardy-Weinberg equilibrium และนำผลการอ่าน genotype ของกลุ่มประชากรที่ศึกษามาหาความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphisms ของยีน *PON2* ที่ nucleotide ตำแหน่ง A148G และ C311S (gene linkage and linkage disequilibrium) โดย Kruskal-Wallis H และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสารชีวเคมีระหว่าง *PON2* genotype โดย Mann-Whitney U-test โดยค่า p-value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ