บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้

3.1.1 ตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงที่รู้ชนิดของยีน HNA-1 โดยวิธี sequence based typing (SBT) จำนวน 3 ราย ประกอบด้วย

- HNA-1aa, -1c negative จำนวน 1 ราย
- HNA-1bb, -1c negative จำนวน 1 ราย
- HNA-1ac, -1c negative จำนวน 1 ราย

3.1.2 ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคเลือดประจำโรงพยาบาลระยอง จำนวน 230 ราย ที่มีเชื้อชาติไทยอย่างน้อย 2 รุ่น โดยการสัมภาษณ์เชื้อชาติของบรรพบุรุษและประวัติทางด้านสุขภาพ และขออนุญาตทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากถุง buffy coat เพื่อใช้ในการวิจัย

งานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ (อ.012/2553)

3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้

ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบหา HNA-1 จำนวน 8 เส้น ได้มาจากรายงานการวิจัยของ Han TH และคณะ (Han TH *et al.* 2006) ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบหาอัลลีลที่จำเพาะกับ HNA-1a, -1b และ -1c จำนวน 6 เส้น และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ human growth hormone (HGH) ซึ่งใช้เป็น internal control (IC) primer จำนวน 2 เส้น ดังนี้

HNA-1AF	5’CAG TGG TTT CAC AAT GTG AA3’
HNA-1AR	5’ATG GAC TTC TAG CTG CAC3’
HNA-1BF	5’CAA TGG TAC AGC GTG CTT3’
HNA-1BR	5’ACT GTC GTT GAC TGT GTC AG3’
HNA-1CF	5’AAG ATC TCC CAA AGG CTG TG3’
HNA-1CR	5’ACT GTC GTT GAC TGT GTC AT3’
HGH-I	5’TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A3’
HGH-II	5’CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC3’

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดผู้บริจาคด้วยน้ำยา red cell lysis buffer (RCLB) และ nuclear membrane lysis buffer (NMLB) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) นำเลือดผู้บริจาคจากถุง buffy coat ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มล.
2) นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,800 rpm นาน 8 - 10 นาที เพื่อให้ส่วนประกอบของเลือดตกตะกอนแบ่งชั้นตามความถ่วงจำเพาะ
3) ใช้ liquipette ดูดพลาสมาทิ้ง
4) เติม 1X RCLB ประมาณ 1 เท่าของปริมาณเลือดที่เหลือในหลอด จากนั้นเขย่าจนเม็ดเลือดแดงแตกเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ
5) นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,800 rpm นาน 5 นาที
6) เทสารละลายสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำที่เกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดงทิ้ง เหลือเซลล์ที่ก้นหลอดส่วนที่เป็นก้อนและ/หรือส่วนที่มีสีขาวไว้
7) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 4 – 6 จนได้ตะกอนเม็ดเลือดขาว
8) เติม NMLB ประมาณ 1 เท่าของเม็ดเลือดขาวที่เหลืออยู่ในหลอดทดลอง เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน
9) นำไป incubate ที่ 56 °C ประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้สารละลายใส
10) เติม chilled 95% alcohol ประมาณ 6 - 8 มล. แล้วเขย่าเบาๆ จนเห็นสายดีเอ็นเอเกาะกันเป็นก้อนสีขาวขุ่น
11) ใช้ liquipette เขี่ยชิ้นดีเอ็นเอไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.
12) เติม 70% alcohol ประมาณ 1 มล. เขย่าแล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง microcentrifuge แล้วเทส่วนใสทิ้งไป ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง
13) เปิดฝาหลอดทดลอง แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จน 70% alcohol แห้งหมด
14) เติม 1X TE buffer ประมาณ 1 มล. หรือจนกว่าจะได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 200 ng/μl แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 °C หรือ -20 °C

3.3.2 การเตรียมส่วนประกอบของการทดสอบ PCR-SSP

1) <u>เตรียม TQR</u> ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0 มล. จำนวน 1,885 μl/tube ประกอบด้วย

- 10X PCR buffer	352.5	μl
- 10 mM dNTPs	250	μl
- 1 mM $MgCl_2$	7.75	μl

- 5% dye 7.5 μl
- Steriled distill water 1,467.5 μl

2) เตรียม Working primer สำหรับตรวจหา HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c ประกอบด้วย

- Internal control primer (forward และ reverse) 0.7 μl/เส้น
- Specific allele primer (forward และ reverse) 1.3 μl/เส้น
- Steriled distill water 246 μl

การตรวจหายีน HNA-1 สำหรับดีเอ็นเอ 1 ราย จะใช้ชุดไพรเมอร์ทดสอบทั้งหมด 3 หลอด ประกอบด้วยหลอดสำหรับตรวจหา HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c โดยแต่ละหลอดจะประกอบด้วย specific allele primer 1 คู่ และ internal control primer 1 คู่ ในปริมาตรรวมเท่ากับ 5 μl/tube

3.3.3 เตรียม working PCR reaction

ในการทดสอบดีเอ็นเอ 1 ราย จะต้องเตรียม working PCR reaction ดังนี้

TQR (10XPCR buffer, dNTPs, $MgCl_2$)	6.7×4 = 26.8	μl/reaction
Taq polymerase (5 unit/μl)	0.3×4 = 1.2	μl/reaction
DNA	1×4 = 4	μl/reaction

3.3.4 นำ working PCR reaction ที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.3 มาหยดลงใน working primer ที่เตรียมไว้เป็นชุดทดสอบ (ดังแสดงในข้อ 3.3.2) หลุมละ 8 μl (ปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 13 μl/reaction)

3.3.5 ปิดฝาหลอดทดสอบแล้วนำไป spin down ก่อนนำไปใส่ในเครื่อง thermal cycle (Mastervapo.protect, Eppendrof, Germany) เพื่อเพิ่มปริมาณของยีนโดยวิธี PCR-SSP โดยใช้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.1)

หลักการ PCR-SSP

ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้สามารถจับกับตำแหน่งของเบสที่จำเพาะต่ออัลลีลของแอนติเจนนั้น ๆ ได้อย่างสมบูรณ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดแถบสัญญาณให้เห็นได้อย่างชัดเจน (ผลบวก) ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะจะไม่ปรากฏแถบสัญญาณขึ้นมาให้เห็น (ผลลบ) แถบสัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยกระบวนการ electrophoresis ต่อไป

ตารางที่ 3.1 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา HNA-1 โดยวิธี PCR-SSP

ขั้นตอน	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**	**เวลา (นาที)**	**จำนวนรอบ**
Denaturation	95	5	1
Denaturation	95	1	30
Annealing	60	1	
Extension	72	1	
Extension	72	5	1

3.3.6 นำผลผลิตที่ได้ (PCR product) มาหาขนาดของดีเอ็นเอบน 2% agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ขนาด 100 โวลต์ (volt) นาน 20 นาที อาศัยการยึดติดระหว่างดีเอ็นเอกับ ethidium bromide เมื่อนำมาถ่ายภาพภายใต้แสง UV จะเห็นการเรืองแสงขึ้นมาบนแผ่นวุ้น แล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel document

3.3.7 อ่านและแปลผลการทดลอง

Positive พบแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับไพรเมอร์ที่ออกแบบ เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

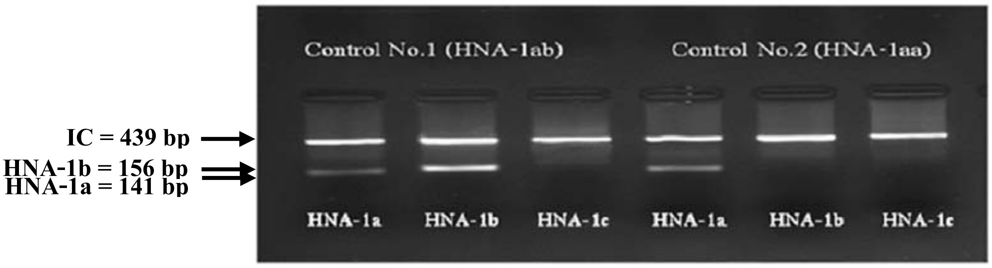
Negative ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับที่ออกแบบ

หมายเหตุ ขนาดของแถบดีเอ็นเอ HNA-1a = 141 base pair (bp)

HNA-1b = 156 bp

HNA-1c = 191 bp

Internal control (IC) = 439 bp



รูปที่ 3.1 การแปลผลการตรวจหา HNA-1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่รู้ชนิดจีโนทัยป์ของ HNA-1

จากรูป ตัวอย่างควบคุมหมายเลข 1 (control No.1) ตรวจพบทั้งแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ HNA-1a และ -1b และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ HNA-1c แปลผลจีโนทัยป์เป็น HNA-1ab, 1c negative ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมหมายเลข 2 (control No.2) ตรวจพบเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ HNA-1a (141 bp) แปลผลจีโนทัยป์เป็น HNA-1aa, 1c negative

3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

3.4.1 คำนวณหาเปอร์เซนต์ความถี่ของจีโนทัยป์ (% genotype frequency; %GF) และเปอร์เซนต์ความถี่ของอัลลีล (%allele frequency; %AF) โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\textbf{\% genotype frequency} = \frac{\text{จำนวน genotype ที่ตรวจพบ}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100$$

$$\textbf{\% allele frequency} = \frac{\text{จำนวนของ allele ที่ตรวจพบ}}{2 \times \text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100$$

3.4.2 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) เพื่อดูความสมดุลของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลองตามกฎของ Hardy-Weinberg Equilibrium โดยใช้โปรแกรม Excel

3.4.3 เปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่ HNA-1a, -1b และ -1c ที่พบในชาวไทยกับเชื้อชาติอื่น ๆ โดยการคำนวณหาค่าไคร์สแควร์ (chi-square; λ^2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS

3.4.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree analysis) โดยการคำนวณค่า Nei's genetic distance ด้วยโปรแกรม phylip version 3.68 และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Splits Tree