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 [Realplex Eppendorf]
- 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]
- 100 base pair DNA marker [Vivantis]
- Boric acid [BDH Chemicals]
- Buffer BB [Vivantis]
- BsrB I [New England biolabs]
- Ethidium bromide [Vivantis]
- Ethylene diamine tetraacetic acid dipotassium salt dihydrate (EDTA•$2H_2O$) [BDH Chemicals]
- GF-1 blood DNA extraction kit [Vivantis]
- Hinf I [New England biolabs]
- Hydrochloric acid (HCl) [Merck]
- 6X loading dye [Vivantis]
- Primers [1st Base]
- Proteinase K [Vivantis]
- S buffer [Vivantis]
- Sodium hydroxide (NaOH) [Merck]
- 2X Taq Master Mix [Vivantis]
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane [Vivantis]

3.2 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลือกกลุ่มประชากรแบบสุ่ม จากประชากรไทยที่เข้ารับบริการตรวจสุขภาพประจำปี ณ สถานเวชศาสตร์ชันสูตร คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ไม่เป็นโรคตับ โรคไทรอยด์ โรคมะเร็ง หรือได้รับยาลดไขมัน และไม่รวมสตรีที่อยู่ในระหว่างมีครรภ์หรือให้นมบุตรจำนวน 207 คน 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 3000 รอบต่อนาที 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 วิธีการศึกษาการกระจายตัวของยีนพาราออกโซเนส 1 ในกลุ่มตัวอย่างประชากรไทย ด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP)

การศึกษาการกระจายตัวของ *PON1* gene ที่ตำแหน่ง T-108C, L55M และ Q192R โดยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) ประกอบด้วยขั้นตอน 4 ขั้นตอน คือ การสกัด DNA (extract DNA) จากเลือดครบส่วน แล้วนำ DNA ที่ได้ไปทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของ *PON1* gene ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) และทำการตรวจสอบ DNA fragment ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่ออ่าน genotype ของยีน จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

3.5.1. การสกัด deoxyribonucleic acid (DNA) จากเลือดครบส่วน ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GF-1 blood DNA extraction kit

หลักการ

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GF-1 blood DNA extraction kit [Vivantis] เป็นการสกัด DNA จากเม็ดเลือดขาวในเลือดครบส่วนโดยอาศัยหลักการ solid-phase isolation หรือ spin columns 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

autoclaved dH_20 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 นาทีจากนั้นดึง 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 autoclaved dH_2O ที่ผ่านการ pre-incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปริมาตร 50 µL ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

10. เติม autoclaved dH_2O 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 การเพิ่มจำนวน polymorphisms ของ gene *PON1* ที่ตำแหน่ง T-108C, L55M และ Q192R ในหลอดทดลองโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

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

นำ primer ที่จำเพาะดังตารางที่ 2 สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 1669 ถึงตำแหน่ง 1906[(GenBank:AF539592.1)] ของ *PON1*-(T-108C) สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 9386 ถึงตำแหน่ง 9529[(GenBank:AF539592.1)] ของ *PON1*-(L55M) ผสมส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มชิ้นส่วน สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA จากตำแหน่ง 18078 ถึงตำแหน่ง 18186[(GenBank:AF539592.1)] ของ *PON1*-(Q192R) ผสมส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มชิ้นส่วน DNA ดังตารางที่ 3 โดยใช้เครื่อง PCR ภายใต้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณยีน *PON1* ที่ตำแหน่ง T-108C และ L55M และ Q192R ดังตารางที่ 4 ซึ่งจะเพิ่มชิ้นส่วน DNA ทำให้ได้ PCR product ของ *PON1*-(T-108C) ขนาด 238 base pair (bp) *PON1*-(L55M) ขนาด 144 bp และ *PON1*-(Q192R) ขนาด 109 bp จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ºC ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP

ตารางที่ 2 primer ของ *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R)

Polymorphism	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
PON1-(T-108C)	GCTAGCTGCGGACCCGGC GGGGAGGAG	GCTGCAGCCCTCACCACAACC
PON1-(L55M)	GAG TGA TGT ATA GCC CCA G	AGTCCATTAGGCAGTATCTCC G
PON1-(Q192R)	GAATGATATTGTTGCTGTGGG	CGACCACGCTAAACCCAAATA CATCTCCCAGAA

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของสารเคมีในการทำ PCR ของยีน *PON1* ที่ตำแหน่ง T-108C, L55Mและ Q192R

สารเคมี	ปริมาตร (µL)		
	PON1-(T-108C)	*PON1*-(L55M)	*PON1*-(Q192R)
1. dH_2O	4.5	-	0.5
2. 2X Taq Master mix	12.5	11.0	12.5
3. Forward primer (10 pm)	2.0	4.0	4.5
4. Reverse primer (10 pm)	2.0	4.0	4.5
5. DNA template	4.0	3.0	3.0

ตารางที่ 4 อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ของ *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R)

ขั้นตอน	*PON1*-(T-108C)	*PON1*-(L55M)	*PON1*-(Q192R)
Initial denaturation	94 °C, 5 นาที	94 °C, 5 นาที	94 °C, 5 นาที
Denaturation	94 °C, 30 วินาที	94 °C, 60 วินาที	94 °C, 60 วินาที
Annealing	69 °C, 45 วินาที	55 °C, 45 วินาที	65 °C, 45 วินาที
Extension	72 °C, 50 วินาที	72 °C, 45 วินาที	72 °C, 45 วินาที
Final extension	72 °C, 10 นาที	72 °C, 10 นาที	72 °C, 10 นาที

3.5.3 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

หลักการ

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

วิธีทำ

1. ผสมส่วนประกอบในการ digest ของ PCR product *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R) ดังตารางที่ 5 แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ส่วนผสมของสารเคมีในการ digest PCR product *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R)

สารเคมี	*PON1*-(T-108C)	*PON1*-(L55M)	*PON1*-(Q192R)
1. dH_2O	3.0 µL	3.0 µL	2.75 µL
2. Buffer no.2	1.5 µL	1.5 µL	1.5 µL
3. Hinf I (10 U/µL)	-	0.5 µL	0.75 µL
4. BsrB I (10 U/µL)	0.5 µL	-	-
6. PCR product	10.0 µL	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 0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer ด้วยความต้านทานไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที และทำการอ่าน genotype โดยการเทียบขนาดชิ้นส่วน DNA กับ DNA marker ขนาด 100 base pair ใช้เครื่อง UV-trans-illuminator gel documentation โดยให้คน อย่างน้อย 2 คนแยกกันอ่านลักษณะแถบที่เกิดขึ้น โดย

ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ BsrB I อยู่ตรงกับตำแหน่งที่ -108 ของยีน *PON1* ซึ่งหากมีเบสเป็น cytosine (C) ทำให้สามารถตัดชิ้นส่วนที่ได้จาก PCR ออกเป็นขนาด 211 bp และ 27 bp

ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ Hinf I อยู่ตรงกับตำแหน่งที่ 55 ของยีน *PON1* ซึ่งหากมี L allele ที่สร้างเป็นกรดอะมิโนชนิด leucine ทำให้สามารถตัดชิ้นส่วนที่ได้จาก PCR ออกเป็นขนาด 122 และ 22 bp

ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ Hinf I อยู่ตรงกับตำแหน่งที่ 192 ของยีน *PON1* ซึ่งหากมี R allele ที่สร้างเป็นกรดอะมิโนชนิด arginine ทำให้สามารถตัดชิ้นส่วนที่ได้จาก PCR ออกเป็นขนาด 75 และ 34 bp

วิธีการเตรียมน้ำยา

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

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

2. เตรียม 10X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer

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

3. เตรียม 0.5X TBE buffer

เจือจาง 10X TBE buffer ปริมาตร 50 mL ด้วย autoclaved dH_2O 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 อย่าให้มีฟองอากาศถ้ามีฟองให้ใช้ comb ลากฟองที่มีให้มาอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของ tray ใส่ comb ลงบนสารละลายด้านบน tray เพื่อทำให้เกิดหลุม (well) รอให้สารละลายแข็งแล้วดึง comb ออก นำ 2.5% agarose gel ใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี 0.5X 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 เพื่อดูแถบของ digested PCR และถ่ายรูป gel เพื่อทำการอ่าน genotype ของ *PON1*-(T-108C), *PON1*-(L55M) และ *PON1*-(Q192R) โดย

Polymorphism ของ *PON1*-(T-108C) ตัวอย่างที่มี thymine (T) จะไม่ถูกเอนไซม์ BsrB I ตัดเมื่อนำไปทำ electrophoresis จะได้ band ที่มีขนาด 238 bp เท่านั้น ในขณะที่ตัวอย่างที่มี cytosine (C) จะถูกเอนไซม์ BsrB I ตัดได้ชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 211 bp และ 27 bp ดังนั้นตัวอย่างที่มี genotype

TT จะมี band ขนาดเดียว คือ 238 bp เท่านั้น

TC จะมี band 3 ขนาด คือ 27 bp, 211 bp และ 238 bp

CC จะมี band 2 ขนาด คือ 27 bp และ 211 bp

Polymorphism ของ *PON1*-(L55M) ตัวอย่างที่มี M allele จะไม่ถูกเอนไซม์ Hinf I ตัดเมื่อนำไปทำ electrophoresis จะได้ band ที่มีขนาด 144 bp เท่านั้น ในขณะที่ตัวอย่างที่มี L allele จะถูกเอนไซม์ Hinf I ตัดได้ชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 122 bp และ 22 bp ดังนั้น ตัวอย่างที่มี genotype

MM จะมี band ขนาดเดียว คือ 144 bp เท่านั้น

LM จะมี band 3 ขนาด คือ 22 bp, 122 bp และ 144 bp

LL จะมี band 2 ขนาด คือ 22 bp และ 122 bp

Polymorphism ของ *PON1*-(Q192R) ตัวอย่างที่มี Q จะไม่ถูกเอนไซม์ Hinf I ตัดเมื่อนำไปทำ electrophoresis จะได้ band ที่มีขนาด 109 bp เท่านั้น ในขณะที่ตัวอย่างที่มี R allele จะถูกเอนไซม์ Hinf I ตัดได้ชิ้นส่วน DNA 2 ขนาด คือ 75 bp และ 34 bp ดังนั้น ตัวอย่างที่มี genotype

QQ จะมี band ขนาดเดียว คือ 109 bp เท่านั้น

QR จะมี band 3 ขนาด คือ 34 bp, 75bp และ 109 bp

RR จะมี band 2 ขนาด คือ 34 bp และ 75 bp

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

นำผลการอ่าน genotype ของกลุ่มประชากรที่ศึกษามาทำการคำนวณหาความถี่การกระจายตัว (gene frequency) ของยีน *PON 1* โดย Gene counting method และ Hardy-Weinberg Equilibrium และนำผลการอ่าน genotype ของกลุ่มศึกษามาศึกษาหาความสัมพันธ์ของ polymorphisms ของยีน *PON1* ที่ตำแหน่ง T-108C, L55M และ Q192R (gene linkage and linkage disequilibrium) โดย Kruskal-Wallis H และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสารชีวเคมีระหว่าง *PON1* genotype โดย Mann-Whitney U-test โดยค่า p-value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ