บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยโรคนิ่วไตในประเทศไทย

ประชากรตัวอย่าง (Sample population)

ผู้ป่วยโรคนิ่วไตที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคนิ่วไต จากข้อมูลภาพถ่ายรังสีเอ็กซ์ (KUB X-ray film) ที่ได้รับการรักษา ณ โรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จ.ขอนแก่น และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย

ตารางที่ 1 เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria)

กลุ่มผู้ป่วยโรคนิ่วไต	กลุ่มควบคุมคนปกติ
• เป็นผู้ป่วยโรคนิ่วไต • อายุ 20 ปีขึ้นไป • เพศชายและหญิง • เชื้อชาติไทย	• เป็นผู้ที่ไม่มีประวัติการเป็นนิ่ว และมีสุขภาพดี • อายุ 20 ปีขึ้นไป • เพศชายและหญิง • เชื้อชาติไทย • ตรวจปัสสาวะไม่พบความผิดปกติ

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

ทั้งกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ่วไตและกลุ่มควบคุม ที่มีความผิดปกติทางกายวิภาคของไตและความผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะอื่นนอกเหนือจากโรคไต เช่น urinary tract infection , polycystic kidney, persistant uretic obstruction, horseshoe kidney, neurogenic bladder, urinary tract malignancy, renal dysfunction และ renal tubular acidosis

ขนาดประชากรตัวอย่าง (Sample size)

การกำหนดกลุ่มประชากรตัวอย่างได้จากการคำนวณหากลุ่มประชากรตัวอย่างจาก งานวิจัยของ Yungjermchan **และคณะในปี** 2006 [5] **พบว่าอัตราการเกิดภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำของผู้ป่วยโรคนิ่วไตเป็นร้อยละ** 100 **และกลุ่มควบคุมร้อยละ** 43.8 **สามารถคำนวณขนาดประชากรตัวอย่างได้จากสมการ**

$$n/group = (Z_{\alpha/2}[2P_c Q_c]^{1/2} + Z_\beta[P_t Q_t + P_c Q_c]^{1/2})^2 / (P_t - P_c)^2$$

กำหนด: $\alpha = 0.05$

$\beta = 0.10$

$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96$ (two-tail)

$Z_\beta = Z_{0.10} = 1.28$

P_t= อัตราการเกิดเหตุการณ์ในผู้ป่วยโรคนิ่วไต = 1.00

P_c= อัตราการเกิดเหตุการณ์ในกลุ่มควบคุม = 0.44

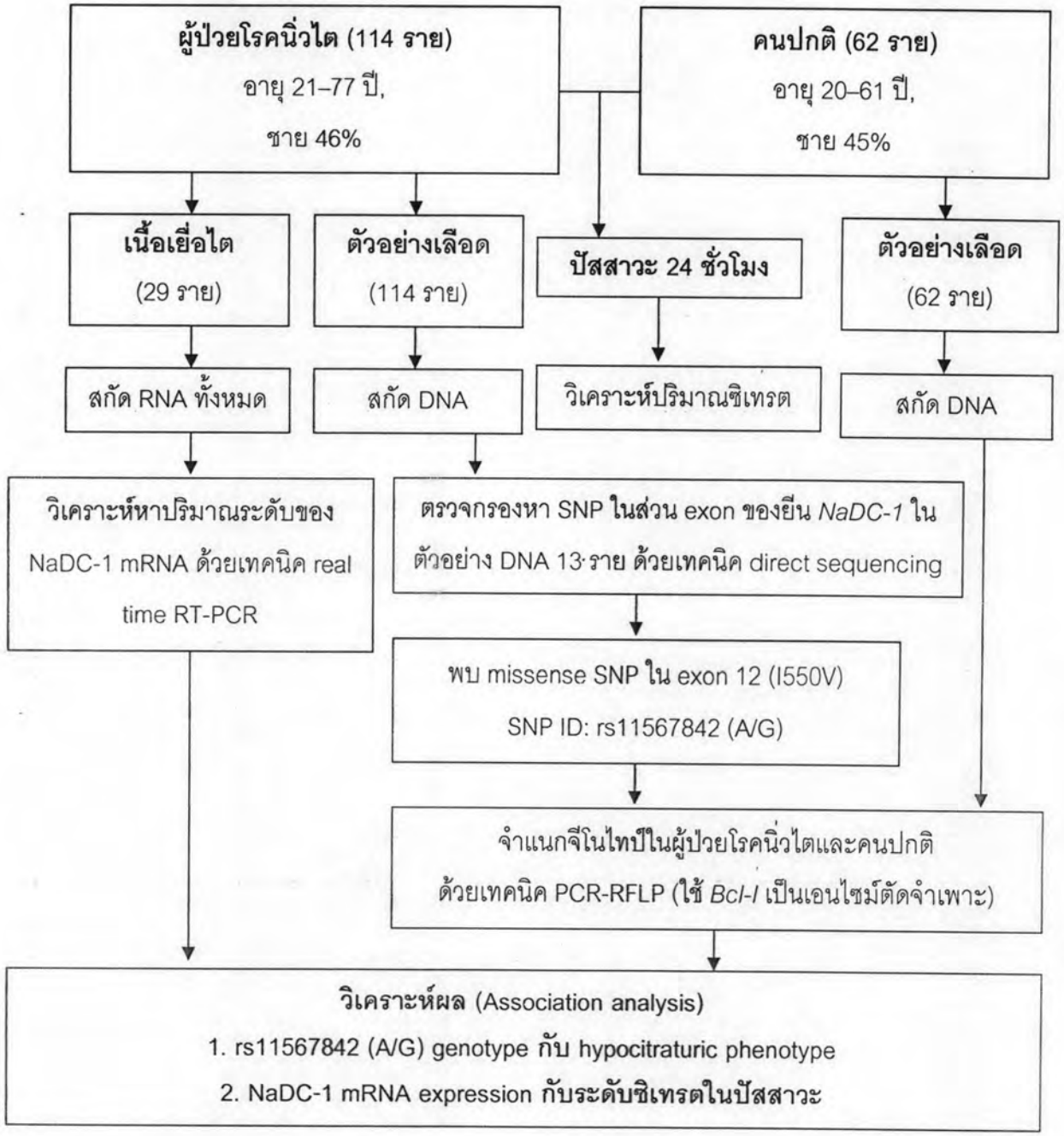
n = 13

จากการแทนค่าในสูตร การวิเคราะห์ความแตกต่างของภาวะซิเทรตในปัสสาวะต่ำในผู้ป่วยโรคนิ่วไตและคนปกติ ต้องใช้ประชากรตัวอย่างอย่างน้อย กลุ่มละ 13 ราย

เนื่องจากการศึกษานี้บางส่วนเป็น genetic association study ซึ่งความน่าเชื่อถือของผลการศึกษาจะต้องมาจากจำนวนตัวอย่างที่มากพอ จำนวนตัวอย่างที่ยอมรับกันทั่วไป (rule of thumb) สำหรับ association study คือ n/group = 100 ดังนั้นจำนวนตัวอย่างสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ (association study) ระหว่าง *NaDC-1* SNP genotype และ hypocitraturic phenotype ควรมีจำนวนประชากรตัวอย่างอย่างน้อย กลุ่มละ 100 ราย

กลุ่มประชากรตัวอย่าง จำนวน และชนิดของสารตัวอย่างที่เก็บจากประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา แสดงในแผนภูมิหน้าถัดไป

แผนภูมิการเก็บตัวอย่างและการทดลอง



เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 2 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Equipments)	**ผลิตภัณฑ์ของ** (Product of)
1) 24-hr urine containers	-
2) 200 ml urine storage containers	-
3) Autoclave	HICLAVE HVE-25, Dublin, Ireland
4) Automatic pH meter	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
5) Autopipette 2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl and tips	BIO-RAD, California, USA
6) Biological safety cabinets	GENCONLAB, Samuthprakarn, Thailand
7) Capillary block	ROCHE, Diethelm, Germany
8) Capillary tube	ROCHE, Diethelm, Germany
9) Centrifuge tubes	CORNING, New York, USA
10) Cuvettes (Plastic and Quartz)	ROCHE, Diethelm, Germany
11) Digital timer	-
12) Distilled water maker	-
13) Electrophoresis power supply	ELITE 300 PLUS, Beaverton - USA
14) Forcep	-
15) UV-transilluminator 2000	BIO-RAD, California, USA
16) Glassware	-
17) High speed centrifuge	SPECTRAFUGE, Utah, USA
18) Horizontal electrophoresis system	SCIE-PLAS, Southam Warwickshire, UK
19) Ice maker	-
20) Incubator	MEMMERT, Schwabach, Germany
21) LightCycler real time PCR	ROCHE, Diethelm, Germany
22) Low speed centrifuge	KOKUSAN, Japan
23) Heat block	Techne, New Jersy, USA
24) Microtube 250 µl, 1 ml and 1.5 ml	-
25) Microwave	-
26) Protective and sanitary items	-
27) Refrigerators and deep freezers	-

เครื่องมือ (Equipments) (ต่อ)	ผลิตภัณฑ์ของ (Product of) (ต่อ)
28) Spectrophotometer	PERKIN ELMER, Massachusetts, USA
29) Vortex mixer	VORTEX-2 GENIE, Massachusetts, USA
30) Water baths	GFL, Burgwedel, Germany
สารเคมี	**ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)**
1) 95%Ethanol	MERCK, Darmstadt, Germany
2) 10x PCR buffer	GE Healthcare, USA
3) Absolute ethanol	MERCK, Darmstadt, Germany
4) Agarose powder	PROMEGA, Madison, USA
5) Citrate lyase	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
6) DMSO (Dimethyl sulfoxide)	CARLO ERBA, Italy
7) dNTP	GE Healthcare, USA
8) Ethidium bromide	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
9) Lactate dehydrogenase	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
10) Malate dehydrogenase	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
11) NADH	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
12) Potassium citrate	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
13) Primers	Operon, Alabama, USA
14) *Bcl-I* restriction enzyme	BioLab, New England, USA
15) SYBR green	QIAGEN, Duesseldorf, Germany
16) Standard creatinine	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany
17) Taq Polymerase	GE healthcare, USA
18) TAE buffer	-
19) TE buffer	-
20) Thymol	ACROS, New Jersey, USA
Software	**ผลิตภัณฑ์ของ (Product of)**
1) CLC DNA workbench 4.0.1	CLCbio, Aarhus, Denmark
2) Light Cycler v.4.05	ROCHE, Diethelm, Germany
3) Oligos	Institute of Biotechnology, University of Helsinki

การเก็บรวบรวมข้อมูล

<u>แนวทางการปฏิบัติต่อผู้ร่วมโครงการศึกษาวิจัย</u>

ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด และศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตขณะทำการผ่าตัด เพื่อทำการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการเก็บตัวอย่าง

1. **การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ** 24 ชั่วโมง **ใช้** Thymol เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บครบ 24 ชั่วโมงแล้วนำมาแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนทำการวิเคราะห์ **ข้อปฏิบัติสำหรับการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ** 24 ชั่วโมง มีดังนี้
   - 1.1 **บันทึกเวลาที่เริ่มเก็บปัสสาวะ (สมมติเริ่ม** 7.00 น.) โดยในครั้งแรกให้ปัสสาวะทิ้ง แล้วเริ่มเก็บปัสสาวะที่ถ่ายครั้งต่อไปในภาชนะที่จัดเตรียมให้ รวมจนครบ 24 ชั่วโมง **(สมมติเวลา** 7.00 น.ของวันถัดไปเป็นครั้งสุดท้าย)
   - 1.2 หากถ่ายอุจจาระควรถ่ายปัสสาวะก่อนทุกครั้ง เพื่อให้ได้ปัสสาวะครบถ้วน และเพื่อป้องกันการมีสิ่งแปลกปลอมปนมากับปัสสาวะ
   - 1.3 ในระหว่างเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยสามารถรับประทานอาหารได้ตามปกติ
2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไตจากการผ่าตัดนิ่วโดยศัลยแพทย์ระบบทางเดินปัสสาวะ แล้วเก็บเนื้อเยื่อไตใน RNA later เพื่อรักษาคุณภาพและปริมาณ RNA ของเนื้อเยื่อไต ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน แล้วจึงนำมาเก็บที่ -70°C ก่อนทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจวัดระดับซิเทรตในปัสสาวะ

ปริมาณซิเทรตในปัสสาวะวิเคราะห์โดย New citrate lyase kit (SIGMA, USA) ตามวิธีของ Toftegaard และคณะ [29] นำปัสสาวะ 24 ชั่วโมง มาทำปฏิกิริยากับ Glycyl-Glycine buffer, Nicotinamide reduced form (NADH), Lactate dehydrogenase (LDH) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (A_1) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Citrate lyase enzyme ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (A_2) ปริมาณซิเตรตคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ($\Delta A = A1 - A2$) ดังสมการ

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \ [g/l]$$

c = citrate concentration [g/l]

V = Final volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed

ε = absorption coefficient of NADH ; at 340nm = 6.3 [l x $mmol^{-1}$ x cm^{-1}]

d = light path [cm]

v = sample volume [ml]

เมื่อแทนค่า V, MW, d และ v ลงในสมการจะได้เป็น

$$c = \frac{3.14 \times 192.1}{\varepsilon \times 1 \times 0.2 \times 1000} \times \Delta A \left[\frac{g}{l}\right]$$

2. การหาค่า Creatinine clearance (CCr)

CCr = (uCr/pCr) × (uV/1440)

uCr = Urinary creatinine

uV = 24-hr urine volume

pCr = Plasma creatinine

1440 = miniutes in 24 hours

2.1 การตรวจวัดระดับครีเอทินีนในพลาสมา (Plasma creatinine)

หลักการ : การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ plasma creatinine ต้องแยกโปรตีนออกก่อน จากนั้นให้ creatinine ในน้ำใส (supernatant) ทำปฏิกิริยากับ picric acid ในสารละลายด่าง เกิดเป็น creatinine picrate ที่มีสีส้ม ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

วิธีทดลอง : สร้างกราฟมาตรฐานของค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm เทียบกับความเข้มข้นของ creatinine

แล้วทดลองโดยปิเปตสารต่างๆ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทดลองตรวจวัดระดับครีเอทินีนในพลาสมา

สาร	Blank	Sample
น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	250	-
Plasma (ไมโครลิตร)	-	250
Protein precipitating agent (ไมโครลิตร)	1500	1500
เขย่าอย่างแรง แล้วนำหลอดที่มี sample ไปปั่น 10 นาที		
ส่วนน้ำใส (ไมโครลิตร)	375	375
0.04 M picric acid (ไมโครลิตร)	125	125
1.4 N NaOH (ไมโครลิตร)	62.5	62.5
เขย่า ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่า OD ที่ 520 nm ทันที		

**Plasma creatinine (mg%) ได้จากการนำค่า OD เทียบค่าจากกราฟมาตรฐาน

2.2 การตรวจวัดระดับครีเอทินีนในปัสสาวะ

หลักการ : ใช้หลักการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ plasma ดังนั้นก่อนอื่นต้องทดสอบปัสสาวะของผู้ทดลองว่ามีโปรตีนหรือไม่โดยวิธี Boilding test ถ้ามีต้องแยกเอาโปรตีนออก โดยวิธีเดียวกับพลาสมา และเนื่องจากความเข้มข้นของครีเอทินีนในปัสสาวะมีสูงมาก ดังนั้นจึงต้องเจือจางปัสสาวะลง 200 เท่า ก่อนการทำปฏิกิริยา

วิธีทดลอง : สร้างกราฟมาตรฐานของค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm เทียบกับความเข้มข้นของ creatinine แล้วทดลองโดยปิเปตสารต่างๆ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การทดลองตรวจวัดระดับครีเอทินีนในปัสสาวะ

สาร	Blank	Sample
น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	250	-
ปัสสาวะเจือจาง 200 เท่า (ไมโครลิตร)	-	250
0.04 M picric acid (ไมโครลิตร)	125	125
1.4 N NaOH (ไมโครลิตร)	62.5	62.5
เขย่า ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่า OD ที่ 520 nm ทันที		

Urinary creatinine (mg%) ได้จากการนำค่า OD เทียบค่าจากกราฟมาตรฐาน

3. การตรวจวัดระดับของ NaDC-1 mRNA ในเนื้อเยื่อไต

นำเนื้อเยื่อไตของกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคนิ่วไต มาทำการสกัด total RNA โดยใช้ RNA isolation kit (Promega, USA) จากนั้นนำ total RNA ที่สกัดได้เปลี่ยนให้เป็น complementary DNA (cDNA) วัดปริมาณ NaDC-1 mRNA โดยวิธี real time polymerase chain reaction (real time PCR) โดยใช้ cDNA เป็น DNA แม่แบบ specific primers ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณ NaDC-1 cDNA คือ

Forward primer: 5'-GGTGACCAAGCTTGATAATGG-3'

Reverse primer: 5'-CTCATGCACTGGGTGAGGT-3'

Product size: 105 bp

รายละเอียดวิธีการทำ real time PCR โดย LigthCycler real time PCR machine (Roche Diagnostic, Germany) มีดังนี้

1. เตรียม mixed primer โดยผสม forward primer และ reverse primer ใน TE buffer, pH 7 (ให้ได้ conc.= 50 µM)
2. แล้วเตรียม PCR mix ดังนี้ (ต่อ 1 reaction)

Master mix	10 µl
deionized H_2O	7 µl
Mixed primer	1 µl
<u>รวม</u>	18 µl

3. ดูด PCR mix จากข้อ 2 มา 18 µl ใส่ลงใน capillary tube
4. ดูด cDNA ของแต่ละตัวอย่างมา 2 µl ใส่ลงในแต่ละ capillary tube
5. นำไปปั่นตก (brief spin) เสร็จแล้วปิดฝา capillary tubes
6. นำลงเครื่อง LightCycler® แล้วตั้งโปรแกรมดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 LightCycler® 2.0 System Protocol

Analysis Mode	Cycles	Sement	Temperature	Hold time	Acquisition Mode
Denaturation					
None	1		95°C	15 min	none
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95°C	15 sec	none
		Annealing	57°C	20 sec	none
		Extension	72°C	25 sec	single
Melting Curve					
Melting Curve	1	Denaturation	95°C	0 sec	none
		Annealing	65°C	15 sec	none
		Melting	95°C Slope = 0.1°C/sec	0 sec	continuous
Cooling					
None	1		40°C	30 sec	none

4. **การตรวจกรองหาความหลากหลายทางพันธุกรรม** (polymorphism screening) **ในยีน** *NaDC-1*

4.1 **การสกัด** genomic DNA (gDNA) **จากสารตัวอย่างเลือด**

4.1.1 นำตัวอย่างเลือดมาปั่นแยกพลาสม่า โดยปั่นที่ความเร็ว 3300 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4.1.2 เติม red blood cell lysis buffer I (Roche, Diethelm, Germany) 12 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 3300 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4.1.3 เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม lysis buffer I 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 3300 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4.1.4 เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร Lysis buffer II 900 ไมโครลิตร และ 10%SDS 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

4.1.5 เติม Phenol-chloroform 500 ไมโครลิตร เขย่าแล้วนำไปปั่นที่ 6000 rpm เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างมีโปรตีนละลายอยู่ ส่วนชั้นบนมี DNA ละลายอยู่ ดูดส่วนล่างทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นที่ 6000 rpm เป็นเวลา 5 นาที อีกครั้งหนึ่ง ระหว่างนี้ให้เตรียมไมโครทิวบ์ (microtube) เพื่อดูดเก็บสารละลายส่วนบน

4.1.6 ดูดสารละลายส่วนบนย้ายใส่ไมโครทิวบ์ *(ต้องระวังอย่าให้มีสารละลายส่วนล่างปะปน)*

4.1.7 เติม Sodium acetate (NaAc) 50 ไมโครลิตร กับ 100% Ethanol (cold) 500 ไมโครลิตร หรือ Ammonium acetate (NH_4OAc) 250 ไมโครลิตร กับ 100% Ethanol (cold) 500 ไมโครลิตร

4.1.8 กลับไมโครทิวบ์ไปมาเบาๆ (Inverse mix) แล้วนำไปแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที

4.1.9 ปั่นแยกที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง

4.1.10 เติม 70%Ethanol 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง DNA นำไปปั่นที่ 14000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

4.1.11 เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดไมโครทิวบ์ เพื่อให้แอลกอฮอร์ระเหยหมด ทิ้งไว้ข้ามคืนหรือจนกว่าจะแห้ง

4.1.12 ละลาย DNA (re-suspended) ด้วย dH_2O หรือ TE buffer 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.2 การวัดความเข้มข้นของ DNA

ความเข้มข้นของ DNA โดยใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometry) และหาความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้สัดส่วนความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ DNA หาได้จากการเทียบ 1 OD_{260} = 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.1 นำ DNA ที่สกัดได้ไปเจือจางประมาณ 50 เท่า

4.2.2 ใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (EV60 UV-Visible, Thermo scientific,United States) โดยใช้โปรแกรมวัดสัดส่วน 260/280

4.2.3 ใช้น้ำหรือ TE buffer เป็น blank ขึ้นอยู่กับว่า DNA ละลายอยู่ในสารละลายชนิดใด

4.2.4 ปริมาณ DNA หาได้จากการเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ซึ่ง 1 absorbance = 50 ng/µl แล้วคูณกลับด้วยค่าที่ใช้เจือจาง DNA (dilution factor = 50)

4.2.5 ความบริสุทธิ์ของ DNA ได้จากค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสง 260/280 นาโนเมตร ซึ่งจากประสบการณ์ของผู้นิพนธ์ค่าควรอยู่ที่ 1.5 ขึ้นไป จึงจะสามารถเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR ได้ดี

4.3 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR

เพิ่มปริมาณ DNA ส่วน exons ของยีน *NaDC-1* จาก gDNA template ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดโดยใช้เทคนิค PCR ตารางที่ 6 แสดง PCR primers ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ในแต่ละ exon ตารางที่ 7 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีในการทำ PCR และตารางที่ 8 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

วิธีการและขั้นตอนทำ PCR มีดังนี้

4.3.1 ผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ตามตารางที่ 7 โดยให้ใส่ DNA เป็นลำดับสุดท้าย ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ แล้วลดปริมาณน้ำลงแทนในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของ DNA ที่เพิ่มขึ้น

4.3.2 นำส่วนผสมทั้งหมดเขย่าให้เข้ากัน ปั่นตก แล้วนำไปใส่ในเครื่อง PCR

4.3.3 ตั้งโปรแกรมดังตารางที่ 8 โดยปรับค่า annealing temperature ตาม primers ที่ใช้

ตารางที่ 6 Specific primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน exons ของยีน *NaDC-1* โดยเทคนิค PCR (ใช้ข้อมูล mRNA จาก NM_003984)

Exons	Primer name	Sequences	Primer sizes	Product sizes (bp)	Number of cases
1	NaDC1_ex1-F	5'-ATA TAA GCC TGC CAC CTG CC-3'	20	295	12
	NaDC1_ex1-R	5'-AAG TTA TGC TGG ATC CTA AGG ATG-3'	24		
2	NaDC1_ex2-F	5'-CAA ATG GCC TGG TTT GTC TG-3'	20	303	12
	NaDC1_ex2-R	5'-TCC TTT GTC AAC AAG GGC TG-3'	20		
3, 4	NaDC1_ex3,4-F	5'-GAA TGC CAG TCT GTG GGA ATG T-3'	22	659	12
	NaDC1_ex3,4-R	5'-CCA AAG GCT CCA AGA TGA CC-3'	20		
5, 6	NaDC1_ex5,6-F	5'-CCT GGA GAC ATC CTC TGT CCT C-3'	22	759	5
	NaDC1_ex5,6-R	5'-TTT GCG CAT CTG TGA AAT GG-3'	20		
7, 8	NaDC1_ex7,8-F	5'-CCT CAG CCT TTA GAT GGT AGG-3'	21	705	8
	NaDC1_ex7,8-R	5'-CCA AGT GTG GTG GAA GGT ACA T-3'	22		
9	NaDC1_ex9-F	5'-ACG CGT TAA GCT CCA AAA GG-3'	20	316	10
	NaDC1_ex9-R	5'-CCT CTG TGG GAC AGA AGC AGG-3'	21		
10	NaDC1_ex10-F	5'-ACC AGG GAG ATG TTA GCA GG-3'	20	355	9
	NaDC1_ex10-R	5'-AAG ACA GGA TAC TCT GCC CAG-3'	21		
11	NaDC1_ex11-F	5'-GTT GTT CCC CAG AGA AGC AG-3'	20	345	10
	NaDC1_ex11-R	5'-GGA CCC GCT CAA CTC TGA GA-3'	20		
12	NaDC1_ex12-F	5'-AAC GGG AGG ACT TCC CAG AG-3'	20	390	7
	NaDC1_ex12-R	5'-GAG CTT GGA GCT TGG AGC TT-3'	20		

ตารางที่ 7 PCR protocol

PCR mixture	Stock conc.	µl/reaction	Final conc.
dH_2O	-	14.5	-
$MgCl_2$	25 mM	1.2	1.5 mM
10x PCR buffer	10x	2.0	1x
dNTP	10 mM	0.4	0.2 mM
Forward primer	10 µM	0.4	0.2 µM
Reverse primer	10 µM	0.4	0.2 µM
Taq Polymerase	5 U/µl	0.1	0.025 U/ µl
DNA template	-	1.0	-
Total volume		**20.0**	

ตารางที่ 8 PCR Condition

Step	Temp.(°C)	Time
Initiation denaturation	94°C	5 min
Cycles (35-40)		
- Denaturing	94°C	45 sec
- Annealing	55°C (exon1/2/10/11/12) or	
	59°C (exon5,6/7,8) or	1 min
	64°C (exon3,4/9)	
- Extension	72°C	1 kb/min
Final extension	72°C	5 min
Holding	15°C or 4°C	∞

4.4 การตรวจสอบ PCR products โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

ละลายผง agarose ลงใน TAE buffer, pH = 8 ให้ได้ความเข้มข้น 1.5% โดยการใช้ความร้อนช่วยละลาย หลังจากผงเจลละลายแล้ว หยดสารละลาย Ethidium bromide ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 µl/ml (หรือ 1 µl ในการเตรียมเจล 100 ml) เทสารละลาย agarose gel ลงในถาดเตรียมเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 45 นาที เมื่อเตรียมเจลเสร็จแล้ว วางใน electrophoresis chamber ที่มี TAE running buffer หยอด (load) PCR product mixture (PCR product 10 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร) ลงในแต่ละหลุม (well) ใช้กระแสไฟฟ้า 110 volt เวลา 30 นาที สำหรับ electrophoresis separation แล้วนำไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง Gel Doc (BIO-RAD, California, USA)

4.5 การส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส (DNA sequencing)

หลังจากการทำ electrophoresis แล้วพบว่าการเพิ่มปริมาณ DNA เป็นผลสำเร็จ นำ PCR product ที่ได้ไปทำให้สะอาดขึ้น (PCR clean up) โดยใช้ ExoSAP kit (USB®, Cleveland, Ohio) เพื่อกำจัด oligonucleotide ที่ปนอยู่ โดยใช้ ExoSAP reagent 3 ไมโครลิตรต่อหนึ่งตัวอย่าง PCR product นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำส่งเพื่อ sequencing (Macrogen, Korea)

4.6 การทำ sequence alignment เพื่อหาความแตกต่างของลำดับเบส

ใช้โปรแกรม CLC DNA Workbench version 4.0.1 นำลำดับเบสที่ได้จากการหาลำดับเบสโดยตรงในทุก exons มาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นเดียว จากนั้นนำลำดับเบสของตัวอย่างทุกตัวอย่างมา alignment จะสามารถตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *NaDC-1* ในแต่ละตัวอย่างได้

4.7 การตรวจสอบ genetic polymorphism โดยเทคนิค PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

เมื่อทราบตำแหน่งที่มี genetic variation หรือได้ candidate SNP แล้ว สามารถตรวจสอบ SNP genotype ได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ (genotype) ได้ PCR-RFLP เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ SNP ในกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้น วิธีการคือเพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่งที่มี SNP ที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้นนำ PCR product ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำไปตรวจสอบประเภทของจีโนไทป์ด้วยเทคนิค agarose electrophoresis

การตรวจสอบ SNP แบบ I550V (rs11567842: A/G) ใน exon 12 ของยีน *NaDC-1* ใช้ forward primer คือ 5'-AACGGGAGGACTTCCCAGAG-3' และใช้ reverse primer คือ 5'-GAGCTTGGAGCTTGGAGCTT-3' อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน denaturation, annealing และ extension คือ 94, 60 และ 72 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้จำนวนรอบ PCR 35 รอบ จากนั้นตรวจสอบขนาดของ PCR product โดย agarose gel electrophoresis ซึ่งจะต้องได้แถบ DNA ที่ขนาด 520 คู่เบส เพียงแถบเดียว จากนั้นนำ PCR product ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BcI-I* โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 9 และ *BcI-I* มีตำแหน่งตัดดังนี้

T/G A T C A
A C T A G/T

หลังจากตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BcI-I* แล้ว ตรวจสอบผลการตัดโดย agarose gel electrophoresis ซึ่งจะได้ genotype 3 แบบ ดังนี้

Homozygous AA genotype : พบแถบ DNA 2 แถบ ขนาด 358 และ 162 bp

Heterozygous AG genotype : พบแถบ DNA 3 แถบ ขนาด 520, 358 และ 162 bp

Homozygous GG genotype : พบแถบ DNA 1 แถบ ขนาด 520 bp

ตารางที่ 9 สภาวะที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ *BcI-I*

Reagent	Stock concentration	µl/reaction	Final concentration
dH_2O	-	2.5	-
BcI-I	10 U/µl	2.5	1.25 U/µl
10x Restriction enzyme buffer	10x	2.0	1x
PCR product	-	13	-
Total volume		**20**	

*บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส, ข้ามคืน

4.8 **การคำนวณหาความถี่จีโนไทป์** (genotype frequency) **และความถี่อัลลีล** (allele frequency)

ถ้า f(AA), f(Aa) และ f(aa) แทนความถี่ของจีโนไทป์ทั้ง 3 แบบ (กรณีมี 2 อัลลีล) จะสามารถหาความถี่อัลลีลได้จากสูตร

$$p = f(AA) + \frac{1}{2}f(Aa) = \ frequency\ of\ A$$

$$q = f(aa) + \frac{1}{2}f(Aa) = \ frequency\ of\ a$$

$$p + q = f(AA) + f(aa) + f(Aa) = 1$$

$$q = 1 - p \ \ and \ \ p = 1 - q$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) สำหรับการนำเสนอข้อมูล ซึ่งจะแสดงข้อมูลค่าเฉลี่ย (mean) หรือ median และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) หรือ interquartile range (IQR) สำหรับตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) นำเสนอเป็นความถี่และร้อยละ สำหรับตัวแปรที่เป็นกลุ่ม (categorical variables) โดยข้อมูลเชิงพรรณนานำเสนอในรูปของกราฟหรือตาราง

สถิติเชิงอนุมาน (Inferential statistics) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร โดยศึกษาจากตัวอย่างที่สุ่มมาเป็นตัวแทน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากลางของข้อมูลจะใช้สถิติทดสอบดังต่อไปนี้

- Two-samples t-test ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ของ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- One-way ANOVA test ใช้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean) ที่มีมากกว่า 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน
- Chi-square test ใช้ทดสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรที่เป็นกลุ่ม
- Spearman's rank correlation test ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่อเนื่อง 2 ตัวแปร
- Logistic regression เป็น multivariate analysis สำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ต่อตัวแปรที่มี 2 ค่า (dichotomous variables)

หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่ตรงตามข้อตกลงเบื้องต้น (assumption) ของ parametric tests ที่กล่าวมาข้างต้น จะใช้ non-parametric tests ที่เหมาะสมแทน โปรแกรมทางสถิติที่ใช้ คือ Stata version 8 (College station, TX, USA) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$