บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

3.1 ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ป่วยด้วยโรค spinocerebellar ataxia และสมาชิกครอบครัวบางครอบครัวที่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้ 79 ครอบครัว จำนวน 200 ราย แบ่งเป็นชาย 86 คน หญิง 114 คน

3.2 สารเคมี

3.2.1 **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด** (DNA extraction from whole blood)

ชื่อสารเคมี	ชื่อบริษัท
EDTA	Italmar
Lysis buffer	Merck
Nondidet	Merck
STE	Merck
SDS	Italmar
Proteinase K	Theera trading
Distilled water	รพ.รามาธิบดี
Phenol	Italmar
Chloroform	Italmar
Na – acetate	Merck
Isopropanol	Merck
Absolute EtOH	Italmar
10X TBE buffer	Italmar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 **สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการทำ** polymerase chain reaction (PCR) **และ** electrophoresis

ชื่อสารเคมี	**ชื่อบริษัท**
PCR buffer	Gibthai
Magnesium chloride	Gibthai
DNTPs	Biogenomed
Enzyme Taq DNA Polymerase	Gibthai
Hi - Di formamide	Applied Biosystems
Agarose gel	Lab Focus
Nusieve	Lab Focus
Ethidium bromide	Merck
Ficol	Sigma
Bromphenal blue	Chatcharee Holding
Trizma Base	Italmar
Boric acid	Italmar

3.2.3 **สารเคมีที่ใช้ในการทำ** Gene scan

ชื่อสารเคมี	**ชื่อบริษัท**
310 Genetic analyzer buffer with EDTA	Applied Biosystems
Gene scan – 500 [ROX] size standard	Applied Biosystems
Performance Optimized Polymer – 4 (POP 4)	Applied Biosystems

3.2.4 **สารเคมีที่ใช้ในการทำ** Sequence DNA

ชื่อสารเคมี	**ชื่อบริษัท**
Big dye	Gene System
Absolute ethanol	Merck
Template Suppression Reagent (TSR)	Gene System
Performance Optimized Polymer – 6 (POP 6)	Applied Biosystems

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 สารที่ใช้เป็น Marker

ชื่อสารเคมี	ชื่อบริษัท
- 100 bp ladder	Pacific Science

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่อง centrifuge
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- Lamina flow
- เครื่อง DNA thermal cycle
- เครื่อง Electrophoresis
- เครื่อง UV transluminater
- เครื่องทำ gene scan (ABI 310)
- เครื่องเขย่า (vortex)
- ชุด QIAquick Gel Extraction Kit

3.6 ไพรเมอร์

Rep – 1 5′ - AAC TGG AAA TGT GGA CGT AC - 3′ ติดสี FAM

Rep – 2 5′ - CAA CAT GGG CAG TCT GAG - 3′

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการศึกษา

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของ CAG ไตรนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำในยีนอะแท็กซิน – 1 หรือ SCA – 1 gene กับความรุนแรงของโรคสไปโนซีรีเบลล่าอะแท็กเซีย แบบที่ 1 ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ คือ

1. ศึกษาอาการทางคลีนิคจากแฟ้มประวัติของผู้ป่วย

เมื่อแพทย์ได้ตรวจคนไข้ที่มารับการรักษา ณ. โรงพยาบาลรามาธิบดี โรงพยาบาลศูนย์จังหวัดสระบุรี สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี โรงพยาบาลศูนย์จังหวัดราชบุรี โรงพยาบาลบุรีรัมย์ และสถาบันประสาทวิทยา แพทย์จะทำการบันทึกอาการ และความเป็นมาของอาการ รวมทั้งถามถึงบรรพบุรุษของคนไข้ว่านอกเหนือจากคนไข้ ยังมีบุคคลใดในครอบครัวเป็นบ้าง จากนั้นจึงทำการบันทึกอาการทางคลีนิคของผู้ป่วย อายุที่เริ่มแสดงอาการของผู้ป่วย รวมทั้งให้แพทย์ได้วินิจฉัยผู้ป่วยแสดงอาการทางคลีนิคต่าง ๆ ว่าอยู่ในระดับใด แล้วแพทย์จะให้ผู้ป่วยไปรับการเจาะเลือด เพื่อนำไปวินิจฉัยในระดับโมเลกุลต่อไป

2. การเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย และสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วยที่สามารถจะเก็บตัวอย่างเลือดได้

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่มีอาการทางคลีนิคว่าเป็นโรค spinocerebellar ataxia ที่ยังไม่สามารถระบุชัดว่าเป็น type ใด รวมทั้งสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วยบางครอบครัวที่สามารถจะเก็บตัวอย่างเลือดได้ จากสถาบันและโรงพยาบาลต่าง ๆ ได้แก่ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี โรงพยาบาลศูนย์จังหวัดสระบุรี สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี โรงพยาบาลศูนย์จังหวัดราชบุรี โรงพยาบาลบุรีรัมย์ และสถาบันประสาทวิทยา รวมทั้งสิ้น 79 ครอบครัว โดยใช้ปริมาณเลือดต่อคนประมาณ 3 - 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปลอดเชื้อที่มี 0.2 M. EDTA 250 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างเลือดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย และสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วย

วันที่ 1

1. นำหลอด polypropylene ที่มีฝาปิดแบบเกลียว มาใส่ 0.2 M. EDTA 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่ตัวอย่างเลือด 3 - 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกลับหลอดขึ้นลง เพื่อให้มีการผสมของสารเกิดขึ้น

2. นำเลือดปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จะพบการแบ่งชั้นของเลือด โดยมีการแบ่งชั้นของพลาสมาข้างบน และชั้นของเม็ดเลือดแดงข้างล่าง

3. ใช้ pasture pipet ดูดเม็ดเลือดแดงและพลาสมาทิ้ง โดยให้เหลือของเหลวที่อยู่ก้นหลอดประมาณ 1 – 2.5 มิลลิลิตร

4. ใส่ lysis buffer ลงในหลอดทดลองจากข้อ 3. ให้ได้ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วกลับหลอดขึ้นลง หรือ ให้มีการผสมกันโดยใช้เครื่องเขย่า (vortex) วิธีการนี้กระทำเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก จะสังเกตเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง

5. นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนที่เป็น supernatant ให้เหลือตะกอน (pellet) บริเวณส่วนล่างของหลอด

6. นำหลอดทดลองจากข้อ 5. มาใส่ nondidet ให้ได้ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วผสมกัน จากนั้นนำไปปั่นตามข้อ 5.

7. ใส่ 10XSTE 300 ไมโครลิตร 10% SDS 150 ไมโครลิตร proteinase K 100 ไมโครลิตร แล้วเติม distilled water ให้ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วใช้ pasture pipette ดูดขึ้นลงให้เข้ากันนำไป incubate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 56°C ทิ้งค้างคืนไว้ 1 คืน (ดังรูปที่ 7.)

วันที่ 2.

1. เติมฟีนอล ให้มีปริมาตรเป็น 1 เท่าของสารละลายจากข้อ 7. คว่ำหลอดไปมาเป็นจำนวน 20 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที

2. ดูดสารละลายส่วนบนทั้งหมดใส่ใน 1.5 มิลลิลิตรไมโครทิวป์ แล้วเติมฟีนอลให้มีปริมาตรเป็น 1 เท่า คว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที

3. ใช้สารละลายคลอโรฟอร์มแทนฟีนอล โดยดูดสารละลายส่วนบนทั้งหมดใส่ใน 1.5 มิลลิลิตร ไมโครทิวป์ ให้คลอโรฟอร์มมีปริมาตรเป็น 1 เท่าของสารละลายทั้งหมด แล้วนำสารละลายที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที

4. นำสารละลายที่ได้มาเติม 3M NaOAc 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มีอยู่ (volume)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ Isopropanol 1 volume ทำการผสมเบา ๆ จะสังเกตเห็นการตกตะกอนของ DNA ที่เห็นเป็นสายดีเอ็นเอเกิดขึ้น

5. ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำใสแล้วเติม 70%alcohol 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 2 นาที

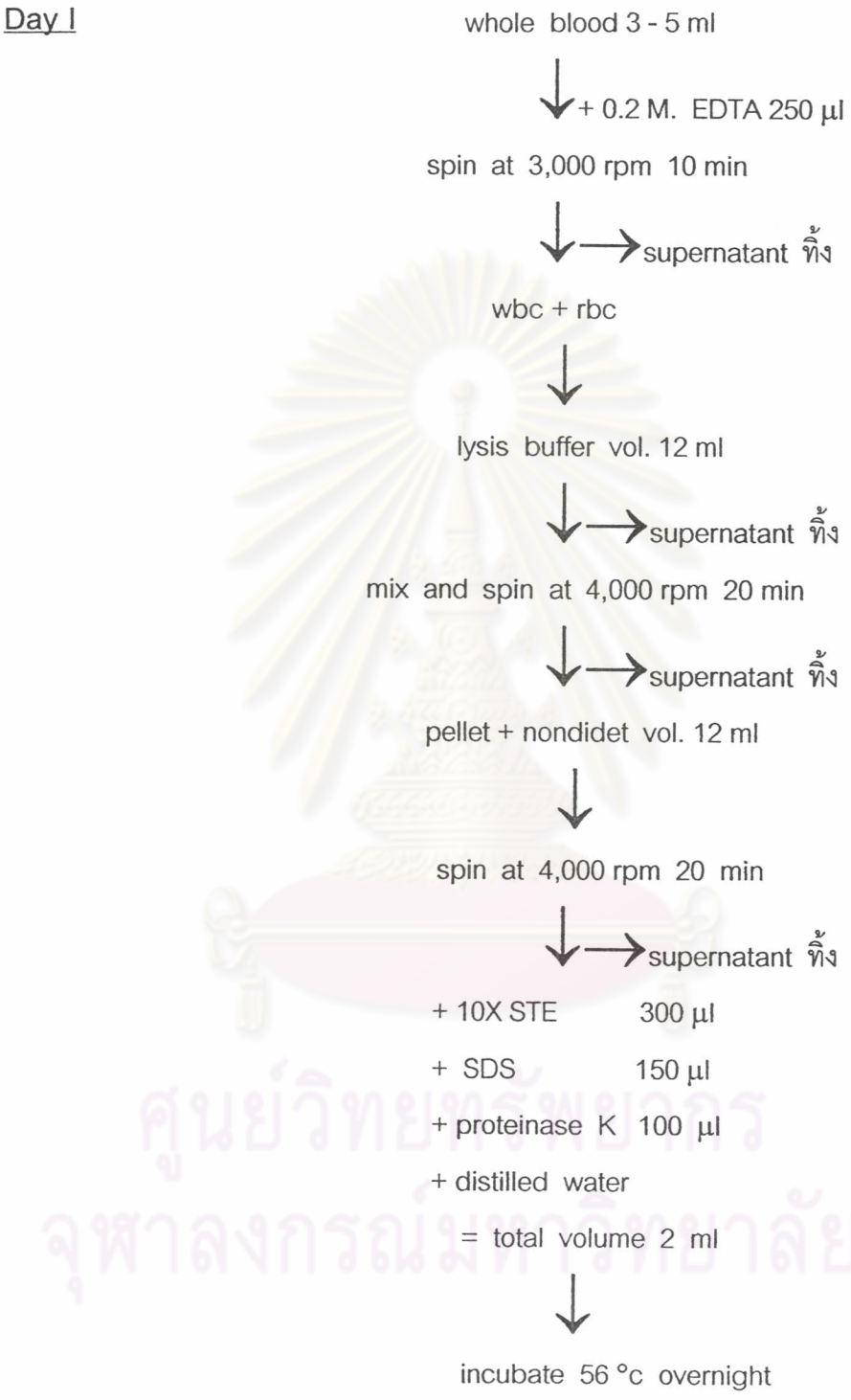
6. ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำใส แล้วเติม absolute alcohol 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 2 นาที แล้วทิ้งส่วนที่เป็นน้ำใส

7. ได้สายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ อยู่บริเวณก้นหลอด แล้วเปิดฝาหลอด ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 37°C ทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน

8. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (ดังรูปที่ 7.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ



รูปที่ 7. แผนภูมิขั้นตอนการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ วันที่ 1. และวันที่ 2.

(ต่อ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Day II

add phenol vol. 1 เท่าปริมาตรเดิม

↓

mix and spin 3,000 rpm 10 min

↓

ดูด supernatant ใส่ 1.5 ml microtube

↓

add phenol vol. 1เท่าปริมาตรเดิม

↓

mix and spin 10,000 rpm 10 min

↓

add chloroform vol. 1 เท่าปริมาตรเดิม

↓

mix and spin 10,000 rpm 10 min

↓

add 3 M NaOac 0.1 vol. + Isopropanol 1 vol.

↓ → supernatant ทิ้ง

70% alcohol 1 ml

↓

spin 10,000 rpm 2 min

↓ → supernatant ทิ้ง

add absolute alcohol 1 ml

↓

spin 10,000 rpm 2 min

↓ → supernatant ทิ้ง

เปิดฝาหลอด ตากดีเอ็นเอ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเพิ่มขยายส่วนของลำดับเบส CAG ที่ซ้ำ (CAG repeat) จากจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

1. นำ 10x Buffer 50 mM $MgCl_2$ 2 mM dNTP 20 μM primers และ formamide มาใส่ที่ใส่หลอด (rack) และนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ดังต่อไปนี้

DNA Template	0.7	μl
10X Buffer	2.5	μl
50mM $MgCl_2$	1	μl
2 mM dNTP	1.5	μl
20 μM primers (Rep – 1)	0.2	μl
20 μM primers (Rep – 2)	0.2	μl
Hi – Di formamide	0.5	μl
Sterile water	18.3	μl
Taq polymerase	0.1	μl

โดยใช้ autopipette ดูดสารละลายแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนดตามลำดับ และควรที่จะใส่ Taq polymerase เป็นขั้นตอนท้ายสุด แล้วทำการผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ไม่ควรที่จะดูดขึ้นดูดลงในจำนวนครั้งที่มากเกินไป (ถ้าทำหลาย ๆ ตัวอย่าง ให้มีการทำเป็น master mix แล้วค่อยแบ่งใส่ไมโครทิวป์ หลอดละ 24.3 ไมโครลิตร แล้วตามด้วย DNA template เพื่อให้ได้มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร)

3. นำแต่ละตัวอย่างมาใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle 9600 โดยจะมีการกำหนดอุณหภูมิ และเวลาตามลำดับต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

94°C	:	4	นาที	1 รอบ
94°C	:	1	นาที	
57°C	:	1	นาที	31 รอบ
72°C	:	1	นาที	
72°C	:	8	นาที	1 รอบ

4. เมื่อทำเสร็จเรียบร้อยแล้ว ก็จะได้ PCR product ตามที่เราต้องการ แล้วนำไปทำ gel electrophoresis

วิธีการทำ gel electrophoresis

1. เตรียม 2% nusieve : agarose gel โดยชั่ง nusieve และ agarose gel อย่างละ 0.25 mg แล้วนำมาใส่ flask 250 มิลลิลิตร

2. เติม 1X TBE 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ข้อที่ 1. เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปต้มใน microwave เป็นเวลา 2 นาที จนได้สารละลายใส ในช่วงขณะรอให้เตรียมถาดใส่เจล พร้อมทั้งใส่หวี (comb) เพื่อให้เจลมีช่องในการใส่ PCR product ติดเทปกาวเพื่อกั้นไม่ให้เจลไหลออกจากถาด

4. เมื่อต้มเสร็จแล้ววางทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 60 – 80 องศาเซลเซียส เติมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในปริมาณที่ความเข้มข้น 10 mg / ml ที่ปริมาตรประมาณ 0.3 – 0.5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้สักครู่ ควรที่จะทำใน Lamina flow เพื่อให้มีการดูดเอาอากาศออกไปสู่ภายนอก แล้วเทใส่ในถาดใส่เจลที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลในถาดแข็งตัวดี

5. ดึงกระดาษกาวออกจากถาด แล้วนำถาดเจลที่ได้ไปใส่ในถาด electrophoresis ที่มี 1XTBE buffer ให้บัฟเฟอร์อยู่ท่วมสูงกว่าผิวหน้าของเจล ค่อย ๆ ดึงหวีออก

6. นำกระดาษพาราฟิล์มตัดให้ได้ขนาดพอเหมาะ แล้วนำปิเปตต์ดูดฟิคอลในปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร / 1 PCR product จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูด PCR product ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร / 1 PCR product มาผสมในฟิคอลที่เตรียมไว้ แล้วนำไปใส่ในช่องของถาดใส่เจล แต่ละช่อง โดยช่องแรกจะใส่ DNA size marker แล้วจึงหยอดสารละลายอื่น ๆ ในช่องถัดไป

7. ต่อสายไฟฟ้าของเครื่อง electrophoresis เข้ากับเครื่อง power supply แล้วเปิดเครื่อง power supply ให้มีแรงเคลื่อนไฟฟ้า 95 – 105 วัตต์ ให้แถบสีน้ำเงินของฟิคอลวิ่งไปจนถึงประมาณครึ่งหนึ่งของถาดเจล จึงปิดเครื่อง power supply ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

8. จากนั้นนำเจลไปล้างน้ำกลั่นประมาณ 5 นาที

9. แล้วนำแผ่นเจลที่ได้ไปส่องดูภายใต้ UV transluminaters เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้กับ DNA size marker แล้วจึงถ่ายรูปด้วยกล้องโพลารอยด์

5. การวิเคราะห์หาจำนวนซ้ำของลำดับเบส CAG ใน DNA ของผู้ป่วยและสมาชิกในครอบครัวผู้ป่วย โดยวิธี Gene Scan

1. นำ Performance Optimized Polymer – 4 (POP 4) มาวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2. เตรียม 310 Genetic Analyzer buffer with EDTA 10X ให้มีความเข้มข้นเป็น 1X โดยนำบัฟเฟอร์มา 1.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น (distilled water) ให้มีปริมาตรทั้งหมด 13 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว แล้วเขย่า

3. นำ 4m vial tube มา 2 tube ใส่บัฟเฟอร์ในปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ tubeที่สองใส่น้ำกลั่นในปริมาตรเท่ากับบัฟเฟอร์

4. นำ tube eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร มา 1 tube ใส่ distilled water

5. เตรียมสารประกอบในแต่ละตัวอย่าง ดังนี้

Hi - Di Formamide	12	ไมโครลิตร
Gene Scan – 500 [ROX] size standard	0.5	ไมโครลิตร
PCR product	0.5	ไมโครลิตร

ให้มีปริมาตรทั้งหมด 13 ไมโครลิตร / 1 ไมโครทิวป์

6. จากนั้นนำ sample ที่เตรียมไว้จากข้อ 5. มาให้ความร้อน (heat) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง

7. นำ sample ที่ได้ไปเข้าเครื่อง 310 ABI สังเกต peak ที่ได้แต่ละตัวอย่าง และบันทึกผล

6. การศึกษาหาลำดับเบส โดยใช้วิธี sequence DNA

6.1 การเพิ่มจำนวน DNA ที่สกัดจากเจล เพื่อเตรียมหาลำดับเบส

1. เตรียม DNA ที่ได้จากการสกัดจากเจล โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit

2. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ดังต่อไปนี้

DNA ที่ได้จากการสกัดจากเจล	3 ไมโครลิตร
Big dye	4 ไมโครลิตร
3.2 pmol / µl primer Rep – 2	1 ไมโครลิตร
Distilled water	12 ไมโครลิตร

ปริมาตรสุทธิทั้งหมด 20 ไมโครลิตร

3. นำแต่ละตัวอย่างมาใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle 9600 โดยจะมีการกำหนดอุณหภูมิ และเวลาตามลำดับต่อไปนี้

96°C	:	10 วินาที	
50°C	:	5 วินาที	25 รอบ
60°C	:	4 นาที	

4. เมื่อทำเสร็จเรียบร้อยแล้ว ก็จะได้ DNA ที่ได้รับการเพิ่มจำนวนแล้ว

6.2 การตกตะกอน DNA (To Precipitate in microcentrifuge tubes)

1. นำปิเปตต์ดูด PCR product 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดไมโครทิวป์ 1.5 มิลลิลิตร
2. ผสม deionized water 16 ไมโครลิตร และ 95% ethanol 64 ไมโครลิตร
3. ปิดฝาหลอดไมโครทิวป์และผสมเบา ๆ ด้วย vortex
4. วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที เพื่อที่จะให้มีการตกตะกอนของ DNA
5. นำหลอดไมโครทิวป์ใส่ใน microcentrifuge พร้อมทำเครื่องหมายไว้ที่ฝาหลอด เพื่อจะได้ทราบตำแหน่งของตะกอน DNA โดยใช้ความเร็วที่สูงสุดประมาณ 14,000 rpm เป็นระยะเวลา 20 นาที
6. ใช้ปิเปตต์ดูดด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากตะกอน (pellets) จะมีลักษณะใสที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น
7. เติม 70% ethanol 250 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ ด้วย vortex
8. ทำเหมือนข้อ 5. เพียงแต่ใช้ระยะเวลา 10 นาที และใช้ความเร็วที่สูงสุดเช่นเดียวกัน
9. ทำเหมือนข้อ 6. แล้วเปิดฝาหลอดไมโครทิวป์ เพื่อจะตากตะกอน DNA ให้แห้ง
10. จนกระทั่งได้ตะกอน DNA

6.3 **การละลายตะกอน** DNA (To resuspend the DNA samples)

1. ละลายตะกอน DNA ที่ตากแห้งด้วย Template Suppression reagent (TSR) ในปริมาตร 12 – 25 ไมโครลิตร

2. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่น

3. นำแต่ละ DNA มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นระยะเวลา 2 นาที แล้วนำไปวางบนน้ำแข็ง

4. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำไปวางบนน้ำแข็ง พร้อมที่จะนำไปใช้

5. นำไปเข้าเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer User's Manual

7. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำของลำดับเบส CAG กับอาการทางคลีนิคของผู้ป่วยที่ป่วยด้วยโรค spinocerebellar ataxia type I

อาการทางคลีนิคของผู้ป่วย ได้แก่ ผู้ป่วยมีอาการเดินเซ พูดไม่ชัด มี cerebellar signs มีการสำลักหรือกลืนลำบาก มีตากระตุกไปมา โดยจะแบ่งออกเป็นระดับในการแสดงอาการทางคลีนิค คือ ระดับ 0 ยังไม่มีอาการแสดงออกมา (normal) ระดับ 1 ผู้ป่วยมีการแสดงอาการแต่ละอย่างออกมาเพียงเล็กน้อย (mildly abnormal) ระดับ 2 ผู้ป่วยจะแสดงอาการออกมาให้เห็นชัดมากขึ้น (moderately abnormal) ระดับ 3 ผู้ป่วยจะแสดงอาการออกมาให้เห็นได้ชัดเจนมากขึ้น โดยจะแสดงอาการออกมาอย่างรุนแรง (severely abnormal) แล้วนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำของลำดับเบส CAG กับอาการทางคลีนิค โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มาวิเคราะห์ นอกเหนือจากนั้นยังหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุที่เริ่มแสดงอาการ และจำนวนซ้ำของลำดับเบส CAG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20652574