ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการสกัดของอาสาสมัครจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม

มีขั้นตอนดังนี้

1. เก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (Buccal cell) จากอาสาสมัคร โดยการใช้ไม้จิ้มฟันขูดเบาๆ บริเวณกระพุ้งแก้มด้านในช่องปากของอาสาสมัคร

2. นำไม้จิ้มฟันดังกล่าวแช่ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1 ml เขย่าเล็กน้อยสลับกับตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 15-30 นาที เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3. นำ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีเซลล์แขวนลอยไปปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาทีจะได้ตะกอนสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ดูดน้ำชั้นบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน

4. ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ml อีก 2 ครั้งดูดซับน้ำชั้นบนทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอนที่ก้นหลอด

5. เติมเม็ด chelex resin ลงไปพอท่วมตะกอนแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 200 µl จากนั้นเติมสารละลาย proteinase K (10 mg/ml) 2 µl ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ

6. แช่อบที่อุณหภูมิ 37 °C นานประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปเขย่าวนประมาณ 5-10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที แล้วนำหลอดทดลองไปต้มเดือดนาน 8 นาที

7. นำไปเขย่าวนอีก 10 วินาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอนเอแม่แบบสำหรับขบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 °C หรือแช่แข็งก็ได้

8. เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ให้ดำเนินตามขั้นที่ 7 ตามต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการแยกแถบดีเอนเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis

1. วิธีเตรียม 34% acrylamide solution
   - acrylamide 16.18 g
   - N,N'methylenebisacrylamide 0.81 g
   - เติมน้ำกลั่นลงในสารให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ml.

2. วิธีเตรียม 10X gel buffer
   - ชั่ง tris 8.0 g
   - เติมน้ำกลั่นลงในสารให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ml
   - ปรับ pH ด้วย sulfuric acid ให้ได้ pH = 4.5

3. วิธีเตรียม 8.5% acrylamide gel
   - น้ำกลั่น 21.26 ml
   - 10X gel buffer 3.7 ml
   - acrylamide solution 9.3 ml
   - 87% glycerol 2.55 ml
   - 10% ammoniumpersulfate 191.0 µl
   - tetramethylethylenediamine 14.0 µl
   - ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ stirrer plate นาน 1 นาที ไม่ควรใช้ความแรงในการหมุนมากเกินไป สังเกตโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศในส่วนผสม
   - เทลงในชุดกระจกสำหรับเตรียมเจล ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงให้แข็งตัว

4. วิธีเตรียม 2.5X running buffer (Stock solution)
   - tris 54.0 g
   - EDTA 3.73 g
   - boric acid 27.5 g
   - เติมน้ำกลั่นลงในสารให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2000.0 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

working Solution (เตรียม 1000 ml)

- running buffer (Stock solution) 400 ml
- น้ำกลั่น 600 ml

5. วิธีแยกแถบดีเอ็นเอ

- ใส่ 2.5X running buffer ลงในแทงค์ประมาณ 1/3 ของแทงค์ วางชุดหล่อเจล ลงในแทงค์ให้ปลายล่างของชุดหล่อ gel จุ่มลงใน running buffer เล็กน้อย เติม running buffer ลงในช่องด้านบนของเจล ล้างหลุมแต่ละช่องโดยใช้ micropipette ขนาด 200 µl ฉีด running buffer ลงไปด้วยความแรงพอควร

- นำ PCR product หยอดลงในหลุมปริมาณ 5 µl จนครบจำนวนที่ต้องการตรวจ

- ใส่ allelic ladder เป็นตัวเปรียบเทียบกำหนดชนิดของอัลลีลเป็นระยะห่างพอควร ประมาณ 2-3 ช่องต่อวุ้นหนึ่งอัน

- ปิดฝาครอบแล้วเปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ (Power supply)

- ใช้กระแสไฟฟ้า 90 volt นาน 16.30 ชั่วโมง

- ทำการย้อมเจลด้วย silver Staining เพื่อให้เห็นแถบดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ขั้นตอนการย้อมเจลด้วยวิธี silver staining

1. เติมสารละลาย 1% nitric acid (3 ml 65% nitric acid + น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 200 ml) ลงไปพอท่วมเจล เขย่านาน 10 นาที

2. เททิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นนาน 5-10 วินาที ล้างเจลซ้ำอีก 2 ครั้ง

3. เติมสารละลาย 0.012M silver nitrate (0.4 g silver nitrate + น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 200 ml) ลงไปพอท่วมเจลเขย่านาน 35 นาที

4. เททิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นนาน 5-10 วินาที ล้างเจลซ้ำอีก 2 ครั้ง

5. เติมสารละลาย 0.28M sodium carbonate และ 0.019% formalin (11.8 g sodium carbonate + น้ำกลั่น 390 ml แล้วเติม 37% formalin 205 µl) ลงไปประมาณ 50 ml เมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลให้เททิ้งและเติมสารละลายที่เหลือลงไป เขย่าจนเห็นแถบดีเอนเอบนเจลชัดเจน แล้วเททิ้ง

6. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% glacial acetic acid (20 ml 100% glacial acetic acid + น้ำกลั่น 180 ml) ลงไปพอท่วมเจลเขย่านาน 5 นาที

7. ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 200 ml นาน 1 นาที 3 ครั้ง หรือจนหมดกลิ่นของ glacial acetic acid

8. นำเจลไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเจล (Gel dryer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นาย ปารเมศ ทองเจริญ
วัน เดือน ปีเกิด	15 พฤษภาคม 2528
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนตากพิทยาคม ปีการศึกษา 2546 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2550 สำเร็จการศึกษาปริญญานิติศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved