ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 10X *Taq* buffer

- 500 mM Tris	20.0	ml
- 2 M KCl	12.5	ml
- 150 mM $MgCl_2$	5.0	ml
- 1% Brovine serum albumin	5.0	ml
- 100% Tween 20	0.25	ml
ปรับปริมาตรด้วย Sterile water ให้ครบ	50.0	ml

2. การเตรียม 1 mM dNTPs

- 100 mM dATP	10.0	µl
- 100 mM dCTP	10.0	µl
- 100 mM dGTP	10.0	µl
- 100 mM dTTP	10.0	µl
- Sterile water	960.0	µl

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันปริมาตร 1,000 µl

3. การเตรียม 1:20 *Taq* DNA polymerase

- *Taq* DNA polymerase (5 U/µl)	5.0	µl
- Sterile water	95.0	µl

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันปริมาตร 100 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียม 1 µM Primers mix (Gallus gallus Cytochrome b)

- Primer F (100 µM)	1.0	µl
- Primer R (100 µM)	1.0	µl
- Sterile water	98.0	µl

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันปริมาตร 100 µl

การเตรียมสารละลายในกระบวนการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 0.5X TBE buffer

- Tris	5.4	g
- Boric acid	2.75	g
- EDTA	0.373	g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	1,000	ml

2. การเตรียม 100 bp DNA marker

- 100 bp DNA marker	2.5	µl
- 6X Loading buffer	2.5	µl

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันปริมาตร 100 µl

3. การเตรียม 10X Loading dye

- Bromophenol blue	0.04	g
- Glycerol 85 %	500.0	µl
- Sterile water	500.0	µl

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันปริมาตร 1,000 µl

4. การเตรียม Ethidium bromide

- Ethidium bromide (10 mg/ml)	10.0	µl
- 0.5X TBE buffer	200.0	ml

นำส่วนผสมเขย่าให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันแล้วเก็บไว้ในที่มืด (Ethidium bromide จะสลายตัวได้เมื่อโดนแสง) และระวังอย่าให้ Ethidium bromide ถูกผิวหนัง เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) มาจากคำ 2 คำ คือ electron + phore โดย electron มาจากภาษากรีก หมายถึง อำพัน สามารถทำให้เกิดไฟฟ้าสถิตได้ และ phore มาจากภาษาละติน หมายถึง ผู้ถือ หรือผู้ที่มี เมื่อนำมารวมกัน จึงหมายถึง โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้า

คำว่า อิเล็กโทรโฟรีซีส มีการเริ่มใช้ตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1909 เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า สารที่มีประจุนั้นจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย ซึ่งสารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้ามกัน นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของดีเอ็นเอยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ได้แก่

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรงเกลียวคู่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล

2. โครงแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน ดีเอ็นเอที่มีโครงแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง และดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด

3. เปอร์เซ็นต์และชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจล โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิก คือ เจลพอลิอะครีลาไมด์ (polyacrylamide gel) และเจลอะกาโรส (agarose gel)

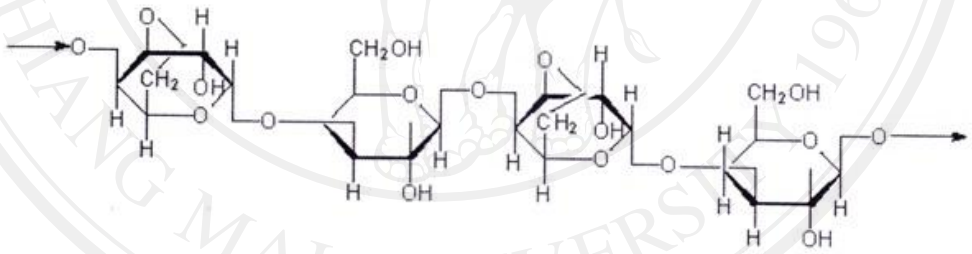
4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงสูงเกินไป ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี ถ้าใช้แรงต่ำเกินไปดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้า แยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ตัวของดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TAE (Tris - Acetate - EDTA), TBE (Tris - Borate - EDTA) และ TPE (Tris - Phosphate - EDTA) ซึ่งการเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษาในรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป

เจลอะกาโรส (agarose gel)

เจลอะกาโรสเป็นพอลิเมอร์ของ D - galactose สลับกับ 3, 6 – anhydrogalactose (ภาพ 17) ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 - 60,000 คู่เบส ซึ่งเจลอะกาโรสที่ดีควรมีค่าการขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก (Electroendosmosis; EEO) ต่ำ การเลือกเจลอะกาโรสต้องใช้ชนิดที่มีความบริสุทธิ์สูงสำหรับใช้ในงานระดับโมเลกุล โดยทั่วไปต้องใช้อุณหภูมิ 80 - 90 องศาเซลเซียส จึงจะหลอมได้ และจะแข็งตัวที่อุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส ส่วนอะกาโรสชนิดที่หลอมได้ที่อุณหภูมิต่ำเกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซีเอทิล เข้าไปในสายพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้สามารถหลอมได้ที่อุณหภูมิอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และไม่ทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอเสียสภาพ



ภาพ 17 โครงสร้างทางเคมีของอะกาโรส ที่แสดงโมเลกุลของ D - galactose สลับกับ 3, 6 – anhydrogalactose

(ที่มา: สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

โดยทั่วไปดีเอ็นเอที่สกัดได้จะนำมาวิเคราะห์หาคุณภาพและปริมาณความเข้มข้นด้วยวิธีการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว สามารถคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นและตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยนำไปเทียบกับ 100 bp DNA marker ที่ทราบความเข้มข้นอยู่แล้ว (จุฑารัตน์ ประภารัตนะพันธุ์, 2548)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอจะสามารถเคลื่อนผ่านบนเจลอะกาโรสได้ด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งดีเอ็นเอมีประจุเป็นลบ จะเคลื่อนตัวจากขั้วลบไปทางขั้วบวก และเคลื่อนไปตามขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าว จะใช้ปริมาณความเข้มข้นของเจลอะกาโรสระหว่าง 0.5 - 6.0 % (w/v) ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ (ตาราง 8) ประกอบกับการใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ตาราง 8 ช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยเจลอะกาโรส

(ที่มา: สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

ปริมาณอะกาโรสในเจล (% w/v)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
0.3	5,000 - 60,000
0.6	1,000 - 20,000
0.7	800 - 10,000
0.9	500 - 7,000
1.2	400 - 6,000
1.5	200 - 4,000
2.0	100 - 3,000

ขั้นตอนการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

1. เตรียม 2% agarose gel โดยชั่ง agarose powder 0.8 g แล้วเติม 0.5X TBE buffer ลงไปปริมาณหนึ่ง ค่อยๆ คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและเติม 0.5X TBE buffer เพิ่มลงไปให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ml จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 65 ˚C จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง
2. เมื่ออุณหภูมิของเจลที่ต้มลดลงประมาณ 50 - 60 ˚C นำไปเทในแม่พิมพ์สำหรับเทเจล แล้วเสียบ comb ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว หลังจากเจลแข็งตัว ค่อยๆ ดึง comb ออก เพื่อให้เกิดหลุมบนเจล
3. เตรียมเครื่อง agarose gel electrophoresis โดยเปิดแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 V นาน 25 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เตรียม 100 bp DNA marker 5 µl และ DNA products 10 µl ซึ่งผสมกับ 1 µl ของ 10X Loading dye
5. นำเจลที่แข็งตัวเสียบลงในเครื่อง จากนั้นโหลด 100 bp DNA marker 5 µl และ DNA products 9 µl ลงในหลุม แล้วเตรียม 0.5X TBE buffer ให้ท่วมเจลพอดี
6. เมื่อครบกำหนดเวลานำเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium bromide นาน 30 นาที แล้วนำเจลไปส่องดูผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จะพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR เทียบกับ 100 bp DNA marker

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของไก่ในส่วนของยีนไซโตโครม บี

ลำดับเบสของไพรเมอร์ (Primer) สองชนิดที่ถูกออกแบบเพื่อใช้ในการศึกษา

Primer F : 5'- GCC CCA TCC AAC ATC TCT GC -3'

Primer R : 5'- GGA GAT TCC GGA TGA GTC AG -3'

ลำดับเบสของ cytochrome b จาก Gallus gallus ช่วงที่เลือกมาทำการศึกษา

14941 AACTCCCTAATCGACCTCCCAGCCCCATCCAACATCTCTGCTTGATGAAATTT
CGGCTCCCTATTAGCAGTCTGCCTCATGACCCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCC
ATGCACTACACAGCAGACACATCCCTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCCACACTTGCCGG
AACGTACAATACGGCTGACTCATCCGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTC
TTCATCTGTATCTTC 15180

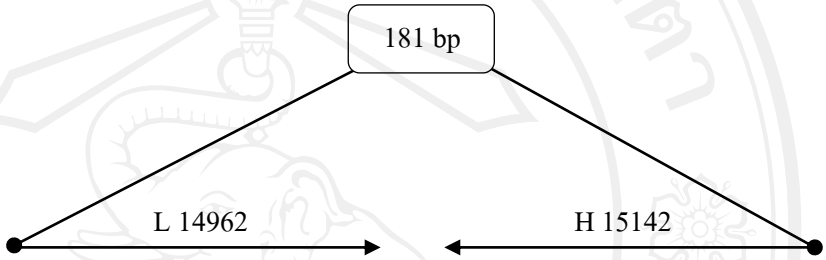
ที่มา : NCBI Reference Sequence: NC_001323.1 (14962 - 15142 = 181 bp)
ref|NC_001323.1| Gallus gallus mitochondrion, complete genome, Length=16775
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001323.1?report=GenBank

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนไซโตโครมบีระหว่างดีเอ็นเอของไก่
กับดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิด (มนุษย์ ปลา หมู วัว และเป็ด)

-



Gallus gallus	GCCCCATCCAACATCTCTGC	~	CTGACTCATCCGGAATCTCC
Human	A**********C**	~	****A******CT*C**T*
Fish	*****C**A*****T**C*T	~	*********T**A**CA*A*
Pig	*****C**A*******AT*	~	A***G*T**T**CT*****A*
Cow	*******TTC**T***GA*T	~	*CT*A*TGGAG*CTGAGGGG
Duck	*******T*TCA***G*C*A	~	*GC*GC*TGATACTGA*A*T

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวมีณญา บุญเจริญ
วัน เดือน ปี เกิด	13 มีนาคม 2530
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง ปีการศึกษา 2545 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง ปีการศึกษา 2548 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาอัญมณีวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved