ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR ขั้นตอนการตรวจสอบ PCR product และการเจือจางน้ำสกัดดีเอ็นเอในลำดับส่วนต่างๆ

1. การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

1. การเตรียม Taq 10X buffer ชั่งสารปริมาณดังนี้

- 200 mM Tris pH 8.4	20.0	ml
- 500 mM KCl	12.5	ml
- 15 mM $MgCl_2$	5.0	ml
- 1 mg/ml BSA	50.0	mg
- 0.5% Tween 20	0.25	ml
เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเป็น	50.0	ml

2. การเตรียม 100 mM dilution of dNTPs ชั่งสารปริมาณดังนี้

- 100 mM dATP	10.0	µl
- 100 mM dCTP	10.0	µl
- 100 mM dGTP	10.0	µl
- 100 mM dTTP	10.0	µl
- H_2O	960.0	µl

ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1000.0 µl

3. การเตรียม DNA-polymerase เจือจาง (ปริมาตร 100 µl)

- *Taq* DNA-polymerase (เข้มข้น 5 U/µl)	5 µl
- เติมน้ำลงไป	95 µl

4. การเตรียม 1 µM Primers mix (ตำแหน่ง cyt b Human)

- Primer F (100 mM)	1.0	µl
- Primer R (100 mM)	1.0	µl
เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเป็น	100.0	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเตรียมสารละลายในขั้นตอนการตรวจสอบ PCR product

1. การเตรียม 0.5X TBE buffer (รศ.อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545)

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

2. การเตรียม 10X loading dye

- bromophenol blue	0.04	g
- 87% glycerol	500	µl
- น้ำกลั่น	500	µl

เขย่าให้เข้ากันจน bromophenol blue ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ glycerol และน้ำกลั่น

3. การเตรียมสารละลาย Ethidium bromide

- Ethidium bromide	10	µl
- 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer	200	ml

เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในที่มืด (ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังโดยตรง เนื่องจาก Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเจือจางน้ำสกัดดีเอ็นเอในลำดับส่วนต่างๆ

1. การเจือจางในระดับ 1:10

- DNA template	1 µl
- เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไป	9 µl

2. การเจือจางในระดับ 1:100

- สารละลายผสมดีเอ็นเอที่เจือจางไว้ในระดับ 1:10	1 µl
- เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไป	9 µl

3. การเจือจางในระดับ 1:1000

- สารละลายผสมดีเอ็นเอที่เจือจางไว้ในระดับ 1:100	1 µl
- เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไป	9 µl

4. การเจือจางในระดับ 1:10000

- สารละลายผสมดีเอ็นเอที่เจือจางไว้ในระดับ 1:1000	1 µl
- เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไป	9 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

แสดงการคำนวณเทียบค่าปริมาณ Hemoglobin (Hb) ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากคราบเลือด

จากข้อมูล ค่าปริมาณ Hb เริ่มต้นที่ได้จากการวัดในเลือดของแต่ละตัวอย่าง

ปริมาณหยดเลือดที่ใช้ในการทำให้เกิดเป็นคราบเลือด =100 µl (0.1 ml)

ขนาดพื้นที่ของคราบเลือดทั้งหมด (πr^2)

ขนาดพื้นที่ที่ตัดนำมาใช้ในการทดลอง = 0.25 cm^2 (0.5 cm x 0.5 cm)

เช่น

ตัวอย่างลำดับที่ 1 วัดค่าปริมาณ Hb ได้ 14.2 gm/dl หรือ 14.2 x 10^7 ng/ml และหยดเลือดปริมาตร 0.1 ml ลงบนผ้า ได้ขนาดพื้นที่ของคราบเลือดประมาณ 3.14 cm^2

จากเลือดปริมาตร	1	ml	มีปริมาณ Hb อยู่	14.2 x 10^7	ng
เลือดปริมาตร	0.1	ml	มีปริมาณ Hb อยู่	1.42 x 10^7	ng

จากขนาดพื้นที่คราบเลือด	3.14	cm^2	มีปริมาณเลือดอยู่	0.1	ml
ขนาดพื้นที่คราบเลือด	0.25	cm^2	มีปริมาณเลือดอยู่	0.00796	ml

จากเลือดปริมาณ	1	ml	ที่มีปริมาณ Hb อยู่	14.2 x 10^7	ng
เลือดปริมาณ	0.00796	ml	จะมีปริมาณ Hb อยู่	1,130,320	ng

ดังนั้น เมื่อนำตัวอย่างคราบเลือดมาทำการสกัดในน้ำสกัดปริมาตร 200 µl. หรือ 0.2 ml บนพื้นที่ผ้าขนาด 0.25 cm^2 ของตัวอย่างที่ 1 จะมีเลือดประมาณ 0.00796 ml. และมีปริมาณ Hb อยู่ประมาณ 1,130,320 ng ซึ่งในการดำเนินปฏิกิริยา PCR แต่ละครั้ง จะดูดน้ำสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอมาใช้เพียง 1 µl (0.001 ml)

จากปริมาณน้ำสกัดดีเอ็นเอ	0.2	ml	ที่มีปริมาณ Hb อยู่	1,130,320	ng
ดังนั้น ในปริมาณน้ำสกัดดีเอ็นเอ	0.001	ml	จะมีปริมาณ Hb อยู่ประมาณ	5,651.6	ng
เมื่อนำมาทำการเจือจางความเข้มข้นลงในระดับ 1:1000 จะเหลือ Hb อยู่ประมาณ				5.65	ng

จากการเทียบค่าทั้งหมด 45 ตัวอย่าง สามารถแสดงผลของข้อมูลต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 ข้อมูลปริมาณ Hemoglobin ที่ได้จากการคำนวณเทียบค่า

ตัวอย่างลำดับที่	ค่า Hb (gm/dl)	พื้นที่ครอบเลือด (cm^2)	ปริมาณเลือด (ml) ในพื้นที่ 0.25 cm^2	ค่า Hb (ng) ในพื้นที่ 0.25 cm^2	ค่า Hb (ng) ในน้ำสกัด 1 µl	ค่า Hb (ng) เจือจาง 1000 เท่า
1	14.2	3.14	0.00796	1,130,320	5,651.6	5.6516
2	11.9	4.52	0.00553	658,070	3,290.4	3.2904
3	15.6	3.80	0.00658	1,026,480	5,132.4	5.1324
4	15.4	4.15	0.00602	927,080	4,635.4	4.6354
5	18.0	4.15	0.00602	1,083,600	5,418.0	5.4180
6	11.6	3.14	0.00796	923,360	4,616.8	4.6168
7	21.5	4.15	0.00602	1,294,300	6,471.5	6.4715
8	12.0	2.83	0.00883	1,059,600	5,298.0	5.2980
9	13.7	4.91	0.00509	697,330	3,486.7	3.4867
10	12.9	3.14	0.00796	1,026,840	5,134.2	5.1342
11	11.5	2.54	0.00984	1,131,600	5,658.0	5.6580
12	13.5	3.46	0.00723	976,050	4,880.3	4.8803
13	15.3	2.83	0.00883	1,350,990	6,755.0	6.7550
14	11.0	2.54	0.00984	1,082,400	5,412.0	5.4120
15	15.4	3.14	0.00796	1,225,840	6,129.2	6.1292
16	11.3	4.15	0.00602	680,260	3,401.3	3.4013
17	11.9	3.14	0.00796	947,240	4,736.2	4.7362
18	10.3	3.14	0.00796	819,880	4,099.4	4.0994
19	10.9	4.15	0.00602	656,180	3,280.9	3.2809
20	9.0	4.15	0.00602	541,800	2,709.0	2.7090
21	21.0	3.14	0.00509	1,671,600	8,358.0	8.3580
22	9.2	4.15	0.00553	553,840	2,769.2	2.7692
23	12.7	4.91	0.00471	646,430	3,232.2	3.2322

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ตัวอย่างลำดับที่	ค่า Hb (gm/dl)	พื้นที่คราบเลือด (cm^2)	ปริมาณเลือด (ml) ในพื้นที่ 0.25 cm^2	ค่า Hb (ng) ในพื้นที่ 0.25 cm^2	ค่า Hb (ng) ในน้ำสกัด 1 µl	ค่า Hb (ng) เจือจาง 1000 เท่า
24	11.5	4.52	0.00553	635,950	3,179.8	3.1798
25	11.5	5.31	0.00471	541,650	2,708.3	2.7083
26	9.0	2.83	0.00883	794,700	3,73.5	3.735
27	10.7	3.14	0.00796	851,720	4,258.6	4.2586
28	12.5	3.80	0.00658	822,500	4,112.5	4.1125
29	9.75	3.80	0.00658	641,550	3,207.8	3.2078
30	13.7	3.14	0.00796	1,090,520	5,452.6	5.4526
31	16.3	2.54	0.00984	1,603,920	8,019.6	8.0196
32	15.3	3.80	0.00658	1,006,740	5,033.7	5.0337
33	18.3	2.83	0.00883	1,615,890	8,079.5	8.0795
34	17.8	4.91	0.00509	906,020	4,530.1	4.5301
35	17.4	3.14	0.00796	1,385,040	6,925.2	6.9252
36	19.1	4.91	0.00509	972,190	4,860.9	4.8609
37	16.5	3.80	0.00658	1,085,700	5,428.5	5.4285
38	18.0	3.14	0.00796	1,432,800	7,164.0	7.1640
39	15.2	3.14	0.00796	1,209,920	6,049.6	6.0496
40	12.3	3.14	0.00796	979,080	4,895.4	4.8954
41	10.8	3.46	0.00723	780,840	3,904.2	3.9042
42	16.7	4.15	0.00602	1,005,340	5,026.7	5.0267
43	12.0	3.14	0.00796	955,200	4,776.0	4.7760
44	9.8	3.14	0.00796	780,080	3,900.4	3.9004
45	15.4	3.80	0.00658	1,013,320	5,066.6	5.0666

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

แสดงการคำนวณค่าดัชนีที่ใช้ประเมินค่าความไวและค่าความจำเพาะของการตรวจสอบ

1. การคำนวณค่าดัชนีที่ใช้ประเมินค่าความไวและค่าความจำเพาะของการตรวจสอบ

1.1 ค่าความไวของการตรวจสอบ คือ ร้อยละของการใช้ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในการตรวจแยกตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ ที่สกัดจากคราบเลือด ที่ตรวจแล้วได้ผลบวก

จากการตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง

ได้ผลเป็นบวก จำนวน 45 ตัวอย่าง

ดังนั้น ค่าความไว = $\frac{45}{45}$ x 100 = 100 %

ค่าความไวเมื่อระดับที่ปริมาณดีเอ็นเอถูกเจือจางลงไป 1000 เท่า (1:1000)

จากจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอจากคราบเลือดมนุษย์ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง

พบผลการตรวจสอบเป็นบวกจำนวน 44 ตัวอย่าง

ดังนั้น ค่าความไว = $\frac{44}{45}$ x 100 = 97.78 %

1.2 ค่าความจำเพาะของการตรวจสอบ คือ ร้อยละของการใช้ตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในการตรวจแยกตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ของมนุษย์ (มาจากสัตว์อื่น ได้แก่ ไก่ สุนัข หมู และวัว ชนิดละ 25 ตัวอย่าง) ที่ตรวจได้ถูกต้องจากการทดสอบว่าเป็นผลลบ

จากการตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากสัตว์ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง

ได้ผลเป็นลบ จำนวน 100 ตัวอย่าง

ดังนั้น ค่าความจำเพาะ = $\frac{100}{100}$ x 100 = 100 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

ช่วงลำดับเบสในตำแหน่งยีนไซโตโครม บี ในดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียของมนุษย์

Human Cytochrome b gene มี Primers เริ่มต้น 2 ตัว คือ

Primer F : 5′ –TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT– 3′

Primer R : 5′ –ACTTGTCCAATGATGGTAAAAGG– 3′

(Matsuda H., 2005)

โดยมีลำดับเบสดังนี้

TTCTCACCAGACCTCCTAGGCGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAAC
ACCCCTCCCCACATCAAGCCCGAATGATATTTCCTATTCGCCTACACAATTCTCCGAT
CCGTCCCTAACAAACTAGGAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCTAGC
AATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATATTTCGCCCACTAAG
CCAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGCAGACCTCCTCATTCTAACCTGAATCGGAGGA
CAACCAGTAAGCTACCCTTTTACCATCATTGGACAAGTAGCATCCGTACTATACTTCA
CAACAATCCTAATCCTAATACCAACTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAAT
GGGCCTGTCCTTGTAGTATAAACTAATACACCAGTCTTGTAAACCGGAGATGAAAAC
CTTTTTCCAAGGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAG
CTAAGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTTCTTTCATGGGGAAGCAGATTTGGGTACC
ACCCAAGTATTGACTCACCCATCAA

ที่มา

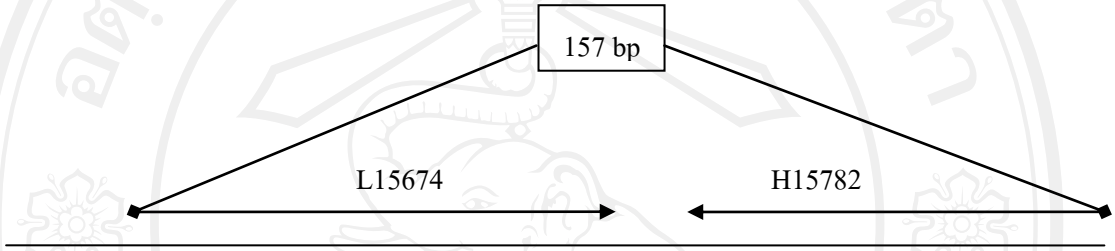
NCBI Reference Sequence: NC_001807 (15648-15804)

> ref|NC_012920.1|Homo sapiens mitochondrion, complete genome, Length=16569

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

การเปรียบเทียบลำดับเบสในยีนไซโตโครม บี บนดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียของมนุษย์
กับลำดับเบสในยีนไซโตโครม บี บนดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียของสัตว์ชนิดอื่น



Human	TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT	~	CCTTTTACCATCATTGGACAAGT
Chicken	⊙CTTCC⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙T⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙C⊙A⊙⊙	~	⊙⊙C⊙⊙C⊙T⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙C⊙⊙⊙A⊙
Dog	⊙G⊙⊙⊙T⊙C⊙⊙T⊙⊙AC⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙C⊙C⊙⊙	~	⊙⊙⊙⊙⊙C⊙T⊙⊙⊙T⊙⊙C⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙
Pig	⊙⊙ATTT⊙⊙⊙⊙G⊙⊙⊙⊙⊙A⊙⊙A⊙⊙C⊙C⊙⊙	~	⊙⊙G⊙⊙C⊙T⊙⊙⊙⊙⊙⊙C⊙⊙C⊙⊙⊙C⊙
Cow	⊙T⊙⊙TC⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙⊙C⊙A⊙⊙A⊙⊙C⊙CC⊙	~	⊙⊙A⊙A⊙⊙T⊙⊙C⊙⊙⊙C⊙⊙⊙⊙⊙⊙C⊙

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวอนุสรา วังกาวี
วัน เดือน ปี เกิด	24 สิงหาคม 2527
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนพงษ์สวัสดิ์วิทยานุเคราะห์ ปีการศึกษา 2542
	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอรุโณทัย ลำปาง ปีการศึกษา 2545
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาฟิสิกส์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved