ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม extraction buffer

Tris-HCl 0.05 M Ph 8.4	100	มิลลิลิตร
NaCl 150 mM	1.7532	กรัม
Cyteine 10 mM	0.1212	กรัม
Ascorbic acid 1 mM	0.0352	กรัม
$CaCl_2$ 1 mM	0.0294	กรัม
Na2-EDTA 1 mM	0.7444	กรัม
Nicotine 2 %	2.00	มิลลิลิตร

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Tris-HCl buffer 0.05 M pH 8.4

Tris	1.1057	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิมิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.4 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม electrode buffer

Tris	6	กรัม
glycine	28.8	กรัม

การเตรียมสารละลายโดยการละลาย Tris 6.0 กรัม และ glycine 28.8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.3 ด้วย 1 N HCl เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาสเซลเซียส เมื่อจะใช้ให้เติมน้ำกลั่นไปอีก 10 เท่าจะได้ pH ประมาณ 8.3 โดยไม่จำเป็นต้องปรับ pH

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม marker dye solution

bromophenol blue	0.05	กรัม
glycerol	1.00	มิลลิลิตร

อัตราส่วน marker dye solution ต่อตัวอย่างเอนไซม์ เท่ากับ 1:10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

5. การเตรียมเจล

stock A ; polyacrylamide gel 30 เปอร์เซ็นต์

acrylamide	28.00	กรัม
N,N-methylene bisacrylamide gel	0.74	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

stock B ; Tris-HCl buffer pH 8.9 ประกอบด้วย

HCl 1 N	48.00	มิลลิลิตร
Tris	36.60	กรัม
TEMED	0.23	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

stock C ; Tris-HCl buffer pH 6.7 ประกอบด้วย

HCl 1 N	48.00	มิลลิลิตร
Tris	5.98	กรัม
TEMED	0.46	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

stock D ; 0.1 % ammonium persulfate

ammonium persulfate	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

อัตราส่วนในการเตรียมเจล

stock solution	separating gel		stacking gel
	8.5 %	10 %	4 %
A (มิลลิลิตร)	12.14	14.29	2.00
B (มิลลิลตร)	5.00	5.00	-
C (มิลลิลิตร)	-	-	2.50
D (ไมโครลิตร)	300	300	300
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	22.86	20.71	15.20

6. การเตรียม phosphate buffer 0.1 M pH 6.0

การเตรียม stock solution

A : 0.1 M solution of monobasic sodium phosphate (13.9 g. in 1,000 ml.)

B : 0.1 M solution of dibasic sodium phosphate (53.65 g. of $Na_2HPO_47H_2O$ or 71.7 g. of Na_2HPO_412H2O in 1,000 ml.)

ใช้สารละลาย A 87.7 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 12.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นพร้อมกับปรับ pH ให้ได้ 6.0 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

7. การเตรียม acetate buffer 0.5 M pH 4.8

การเตรียม stock solution

A : 0.5 M solution of acetic acid (28.875 ml. In 1,000)

B : 0.5 M solution of sodium acetate (41 g. of C_2H_2ONa or 68 g. of $C_2H_2O_2Na3H_2O$ in 1,000 ml.)

ใช้สารละลาย A 20.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 30.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นพร้อมกับปรับ pH ให้ได้ 4.8 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

8.1 acid phosphatate

สารเคมี

1. acetate buffer 0.5 M Ph 4.8	100	มิลลิลิตร
2. fast blue-B salt	100	มิลลิกรัม
3. 1 % -napthyl acid phosphate (monosodium salt)	100	มิลลิกรัม
4. $MgCl_2$ 10 %	10	หยด

วิธีการเตรียม นำสารในข้อ 1,2 และ 3 ละลายให้เข้ากันดี แล้วกรองในที่มืด ก่อนย้อมสีเติมข้อ 4 ลงไป แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที จากนั้นล้างเจลให้สะอาดและเก็บเจลในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินและตรึงสีย้อม

8.2 esterase

สารเคมี

1. phosphate buffer 0.1 M pH 6.0	100	มิลลิลิตร
2. fast blue-B salt	100	มิลลิลิตร
3. 1 % napthyl acetate in absolute alcohol	3.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม นำสารในข้อ 1 และ 2 ละลายให้เข้ากันดี แล้วกรองในที่มืด ก่อนย้อมสี เติมข้อ 3 ลงไป แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที จากนั้นล้างเจลให้สะอาดและเก็บเจลในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินและตรึงสีย้อม

ตารางที่ 19 ค่า Binary Squared Euclidean Dissimilarity Coefficient Matrix ของการทดลองที่ 1

	FER	MAM	ME1	ME2	ME3	ME4	NIG	SAN	SEA	SPI
MAM	9.000									
ME1	7.000	10.000								
ME2	7.000	10.000	.000							
ME3	8.000	9.000	1.000	1.000						
ME4	7.000	10.000	.000	.000	1.000					
NIG	14.000	19.000	13.000	13.000	14.00	13.00				
SAN	7.000	8.000	4.000	4.000	5.000	4.000	15.000			
SEA	18.000	19.000	11.000	11.000	12.000	11.000	12.000	15.000		
SPI	11.000	16.000	8.000	8.000	9.000	8.000	7.000	10.000	7.000	
TOR	4.000	9.000	7.000	7.000	8.000	7.000	14.000	3.000	18.000	11.000

ตารางที่ 20 ค่า Agglomeration Schedule using Average Linkage (Between Groups) ของการทดลองที่ 1

Stage	Clusters Combined			Stage Cluster 1st Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2	Coefficient	Cluster 1	Cluster 2	
1	4	6	.000000	0	0	2
2	3	4	.000000	0	1	3
3	3	5	1.000000	2	0	6
4	8	11	3.000000	0	0	5
5	1	8	5.500000	0	4	6
6	1	3	6.250000	5	3	8
7	9	10	7.000000	0	0	9
8	1	2	9.285714	6	0	10
9	7	9	9.500000	0	7	10
10	1	7	12.958333	8	9	0

ตารางที่ 21 ค่า Binary Squared Euclidean Dissimilarity Coefficient Matrix ของการทดลองที่ 2

	FER	MAM	MEL	NIG	SAN	SEA	SPI	TOR
MAM	1.0000							
MEL	.0000	1.0000						
NIG	6.0000	7.0000	6.0000					
SAN	.0000	1.0000	.0000	6.0000				
SEA	5.0000	6.0000	5.0000	1.0000	5.0000			
SPI	4.0000	5.0000	4.0000	4.0000	4.0000	3.0000		
TOR	.0000	1.0000	.0000	6.0000	.0000	5.0000	4.0000	

ตารางที่ 22 ค่า Agglomeration Schedule using Average Linkage (Between Groups) ของการทดลองที่ 2

Stage	Clusters Combined			Stage Cluster 1st Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2	Coefficient	Cluster 1	Cluster 2	
1	5	8	.000000	0	0	2
2	1	5	.000000	0	1	3
3	1	3	.000000	2	0	5
4	4	6	1.000000	0	0	6
5	1	2	1.000000	3	0	7
6	4	7	3.500000	4	0	7
7	1	4	5.200000	5	6	0

ตารางที่ 23 ค่า Euclidean Dissimilarity Coefficient Matrix การทดลองที่ 3

	FER	MAM	ME1	ME2	ME3	ME4	NIG	SAN	SEA
MAM	.4413								
ME1	.3179	.3441							
ME2	.2696	.3593	.1345						
ME3	.3098	.3732	.2453	.1837					
ME4	.3251	.2320	.2573	.2340	.2226				
NIG	.3111	.3581	.1267	.1414	.2641	.2490			
SAN	.3198	.3551	.1644	.2062	.2907	.2888	.1819		
SEA	.4119	.3644	.2020	.2872	.3483	.3403	.2757	.2351	
TOR	.3215	.3777	.1596	.1907	.2733	.2889	.1777	.1972	.2842

ตารางที่ 24 ค่า Agglomeration Schedule using Average Linkage (Between Groups) การทดลองที่ 3

Stage	Clusters Combined			Stage Cluster 1st Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2	Coefficient	Cluster 1	Cluster 2	
1	3	7	.126724	0	0	2
2	3	4	.137948	1	0	3
3	3	10	.175988	2	0	4
4	3	8	.187416	3	0	6
5	5	6	.222587	0	0	7
6	3	9	.256849	4	0	7
7	3	5	.271986	6	5	8
8	1	3	.323335	0	7	9
9	1	2	.356140	8	0	0

ตารางที่ 25 ค่า Binary Squared Euclidean Dissimilarity Coefficient Matrix ของการทดลองที่ 4.1

	FER	MAM	MEL	NIG	SAN	SEA	SPI
MAM	3.0000						
MEL	2.0000	1.0000					
NIG	3.0000	2.0000	1.0000				
SAN	4.0000	3.0000	2.0000	3.0000			
SEA	3.0000	2.0000	1.0000	2.0000	3.0000		
SPI	2.0000	1.0000	.0000	1.0000	2.0000	1.0000	
TOR	4.0000	3.0000	2.0000	3.0000	4.0000	3.0000	2.0000

ตารางที่ 26 ค่า Agglomeration Schedule using Average Linkage (Between Groups) ของการทดลองที่ 4.1

Stage	Clusters Combined			Stage Cluster 1st Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2	Coefficient	Cluster 1	Cluster 2	
1	3	7	.000000	0	0	2
2	3	6	1.000000	1	0	3
3	3	4	1.333333	2	0	4
4	2	3	1.500000	0	3	5
5	2	8	2.600000	4	0	6
6	2	5	2.833333	5	0	7
7	1	2	3.000000	0	6	0

ตารางที่ 27 ค่า Binary Squared Euclidean Dissimilarity Coefficient Matrix

Variable	ME1	ME2	ME3
ME2	2.0000		
ME3	2.0000	.0000	
ME4	2.0000	.0000	.0000

ตารางที่ 28 ค่า Agglomeration Schedule using Average Linkage (Between Groups)

Stage	Clusters Combined			Stage Cluster 1st Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2	Coefficient	Cluster 1	Cluster 2	
1	3	4	.000000	0	0	2
2	2	3	.000000	0	1	3
3	1	2	2.000000	0	2	0

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายบงการ พันธุ์เพ็ง

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 8 ซอยสรรพสิทธิ์ 1 ถนนสรรพสิทธิ์ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000 โทรศัพท์ 045-243032
E-mail : jimcatth@yahoo.com

วัน เดือน ปีเกิด 10 กุมภาพันธ์ 2517

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษาที่จบ
ประถมศึกษา	โรงเรียนอนุบาลอุบลราชธานี	2528
มัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนเบ็ญจะมะมหาราช	2532
มัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนเบ็ญจะมะมหาราช	2535
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2540

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University