

## ภาคผนวก

### การเตรียมสารละลาย

#### 1. Ethidium bromide (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

Ethidium bromide	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำ Ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer เก็บสาร ละลายไว้ในขวดสีชา หรือ ห่อด้วย aluminum foil ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 2. 0.5 M EDTA (1 ลิตร)

Disodium ethylenediaminetetraacetic acid $2H_2O$	136.1	กรัม
--	-------	------

น้ำกลั่น

NaOH

ชั่ง Disodium ethylenediaminetetraacetic acid.  $2H_2O$  136.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนอย่างแรง ปรับ pH โดยเติมแก๊ส NaOH ลงไปจนได้ pH เท่ากับ 8.0 ผง EDTA จะละลายหมดพอดี ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 3. Formamide dye (5 มิลลิลิตร)

98 % formamide	4.9	มิลลิลิตร
----------------	-----	-----------

10mM EDTA	18	มิลลิกรัม
-----------	----	-----------

bromophenol blue (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	5	มิลลิกรัม
--	---	-----------

xylene cyanol (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	5	มิลลิกรัม
---------------------------------------	---	-----------

ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บสารไว้ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 4. 5x Loading buffer (5 มิลลิลิตร)

1 M Tris pH 8.0	0.25	มิลลิลิตร
-----------------	------	-----------

0.5 mM EDTA	0.05	มิลลิลิตร
-------------	------	-----------

25 % Glycerol	1.25	มิลลิลิตร
---------------	------	-----------

0.2 % bromophenol blue	0.01	กรัม
------------------------	------	------

0.2 % xylene cyanol	0.01	กรัม
---------------------	------	------

น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3.45 มิลลิลิตร  
 เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 5. 5 M NaCl

NaCl 29.2 กรัม  
 น้ำกลั่น

ละลายสาร NaCl 29.2 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## 6. Phenol

Phenol 100 มิลลิลิตร  
 8-Hydroxy quinoleine sulfate 400 มิลลิลิตร  
 0.1 M และ 1 M Tris-HCl pH 8.0 200 มิลลิลิตร  
 $\beta$ -mercaptoethanol 200 ไมโครลิตร

นำ Phenol มาหลอมละลายในอ่างน้ำควบคุม (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วเติม 8-Hydroxy quinoleine sulfate และ 1 M Tris-HCl pH 8.0 กวนอย่างแรงด้วย magnetic stirrer นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วดูดเอา aqueous phase ขึ้นบนออก จากนั้นเติม 1 M Tris-HCl pH 8.0 เพื่อทำการปรับ pH ซ้ำอีก 2 ครั้ง จนกระทั่ง pH ของ Phenol มากกว่า 7.8 จึงเติม  $\beta$ -mercaptoethanol และ 1 M Tris-HCl pH 8.0 เพื่อปิดผิวสารละลาย และเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 7. 10x TBE buffer (Tris borate/ EDTA buffer)

Tris base 108 กรัม  
 Boric acid 115 กรัม  
 0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 8. TE buffer

Tris base 12.114 กรัม  
 0.5 mM EDTA pH 8.0 200 ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 9. 1M Tris-HCl

Tris base 121 กรัม  
น้ำกลั่น

ละลาย Tris base 121 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้นจนได้ pH ที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## การเตรียมแผ่นอกาโรสเจล

1. เตรียมแผ่น อกาโรสเจล เข้มข้น 1.7% โดยชั่ง อกาโรส 1.7 กรัม ผสมลงใน 1x TBE buffer 100 มิลลิลิตร ต้มจนอกาโรสละลายจนหมด จากนั้นเติม 1% ethidium bromide จำนวน 10 ไมโครลิตร

2. ทำความสะอาดถาดเจล และหวีเสียบ (comb) ซึ่งมี 20 ช่อง (well) ด้วย 70% ethyl alcohol แล้วใช้เทปพลาสติกใสปิดขอบถาดทั้ง 2 ด้าน

3. วางหวีเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล

4. เท อกาโรส ที่หลอมแล้วลงในถาด โดยให้มีความหนาของแผ่นอกาโรสเจล ประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว

5. เมื่ออกาโรสเจลแข็งตัว นำ 1xTBE buffer เททับบน อกาโรสเจล (soak gel) เพื่อป้องกันไม่ให้เจลแห้งและสะดวกต่อการดึงหวีเสียบออก แผ่นอกาโรสเจลที่เตรียมหากยังไม่ต้องการใช้ ให้หุ้มด้วยถุงพลาสติกแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น หรือ แช่ในบัฟเฟอร์

## การวิเคราะห์ด้วย อกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

1. นำแผ่น อกาโรสเจลที่เตรียมไว้แกะพลาสติกที่ติดขอบถาดทั้ง 2 ด้านออกวางลงในอ่าง โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ด้านข้าง

2. เท 1x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่นอกาโรสเจล โดยให้แผ่นเจลอยู่ใต้ TBE buffer ประมาณ 1-3 มิลลิเมตร

3. ผสม DNA loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อยๆหยอดลงในช่องของอกาโรสเจลที่เตรียมไว้

4. ปิดฝาอ่างและต่อขั้วเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (ภาพ 37 ก) โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 90 V กระแสไฟฟ้า 400 mA ใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง หรือ สังเกตสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ด้านปลายแผ่นอกาโรสเจล จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

5. นำแผ่น อคาโรสเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator
6. บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Document

#### การเตรียมอุปกรณ์สำหรับโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ควรทำในตู้ดูดไอพิษ)

1. เคลือบกระจกสั้น (IPC plate) เพื่อไม่ให้เจลติด โดยหยด sigmacoat (ภาพ 38) ลงบนกระจกประมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้กระดาษ kimwipe เกลี่ย sigmacoat ให้ทั่วกระจก แล้วปาดจากบนลงล่าง

2. เคลือบกระจกยาวเพื่อให้เจลติด ด้วย bind silane (ภาพ 39) (95% ethanol จำนวน 1 มิลลิลิตร, acetic acid ความเข้มข้น 100% จำนวน 50 ไมโครลิตร, bind silane จำนวน 3 ไมโครลิตร) ควรเตรียมก่อนการใช้ และควรทำกับกระจกด้านเดิมตลอด หยด bind silane ลงบนกระจก จากนั้นใช้กระดาษ kimwipe เกลี่ยให้ทั่วกระจก แล้วปาดจากบนลงล่าง ทิ้งไว้ประมาณ 4-5 นาที เช็ดซ้ำด้วย 95% ethanol จำนวน 2 มิลลิลิตร โดยปาดทางเดียว แล้วเช็ดซ้ำในทิศทางตั้งฉาก ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเปลี่ยนกระดาษ kimwipe

3. การประกอบกระจก ให้หัน IPC plate ด้านที่เคลือบ sigmacoat ขึ้นวาง spacer (ภาพ 40 ก) ให้ขอบล่างเสมอกับกระจกและด้านข้างชิดขอบพลาสติก วางกระจกยาวด้านที่เคลือบด้วย bind silane ลง จากนั้นจับชุดอุปกรณ์ให้ตั้งขึ้น ให้ IPC plate ชิดตัว กระจกยาวหันออก จัดให้ขอบล่างของกระจกและ spacer ชิดพื้น ใส่ตัวหนีบ ให้แกนตั้งฉากกับ IPC plate พับแกนเข้าหา IPC plate โดยที่ให้ด้านล่างเสมอกัน จากนั้นให้เช็คโดยการใส่หวี (comb) ว่าพอดีหรือไม่ ถ้าพอดีหวีจะมีการติดกระจกเล็กน้อย (ภาพ 40 ข)

#### การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 6%

- |               |           |
|---------------|-----------|
| 1. ชั่ง Urea  | 22.5 กรัม |
| acrylamide    | 3 กรัม    |
| bisacrylamide | 0.15 กรัม |

ผสมลงใน 10x TBE buffer 5 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำกลั่นที่หนึ่งมาเชื้อแล้ว 45 มิลลิลิตร คนให้ละลาย
3. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
4. นำไปลูดอากาศ เป็นเวลา 15 นาที
5. เติม TEMED จำนวน 50 ไมโครลิตร  
25% APS จำนวน 50 ไมโครลิตร

## การเทเจล

จัดอุปกรณ์กระจกที่เตรียมไว้ในห้องประกอบขนานกับพื้น ใช้หลอดฉีดยาคัดโพลิอะครีลาไมด์เจล แล้วฉีดเจลเข้าไประหว่างชุดกระจกต่างๆต้องระวังไม่ให้มีฟองอากาศ ให้เสร็จภายในเวลา 40-45 วินาที เติมเจลจนล้นจากกระจกชั้น โดยให้เต็มความกว้างของกระจก (ห้ามขยับหลอดฉีดยา) จากนั้นเสียบหวี (comb) โดยเอาด้านเรียบเข้า ให้ลึกลงประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งเอาไว้ประมาณ 30-60 นาที หรือข้ามคืน

## โพลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กทรอนิกส์

1. เมื่อโพลิอะครีลาไมด์เจลแข็งตัว ถอดเข็มฉีดยาออกแล้วประกอบชุดอุปกรณ์ โดยติด temperature indicator เข้าตรงกลางของกระจกยาว จากนั้นวางอุปกรณ์ใน universal base ใส่ stabilizer bar เพื่อให้กระจกอยู่ในแนวตั้งฉากโดยให้หัว screw ชนกับผนังด้านหน้าของ universal base ความยาวของ screw ต้องพอดี เพื่อให้กระจกวางแน่นหนา
2. ปรับปุ่มฐานของ base ให้ได้ระดับ ไม่ให้ buffer หกหรือกระจกล้ม สองประกอบ safety covers ทั้ง 2 อัน และอาจต้องขยับ IPC assembly เพื่อให้พอดี จากนั้นเติม 1xTBE buffer ใน IPC ให้มีระดับอยู่ประมาณ 1 เซนติเมตรของช่องเติมตลอดเวลา
3. ถอดหวี (comb) และใช้เข็มฉีดยาล้างช่องด้วย 1xTBE buffer เพื่อกำจัด Urea
4. เสียบหวี โดยเอาซี่ลงจนปลายฟันแตะขอบเจล
5. เติม 1xTBE buffer ลงใน lower buffer chamber ประมาณ 300-500 มิลลิลิตร จากนั้นปิด safety covers ทั้งบน-ล่าง และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (ภาพ 37 ข) ทำการ pre-run ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กระแสไฟฟ้า 55 W เป็นเวลา 20 นาที
6. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ไปให้ความร้อนใน อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 95-100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาทีแล้วนำวางลงบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมสีย้อม (formamide dye) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อยๆหยอดลงในช่องของหวี อย่าให้อุณหภูมิของ buffer ตก จากนั้นปิด safety covers ทั้งบน-ล่าง run ที่กระแสไฟฟ้า 55 W ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง หรือถึงจุดสีย้อมเคลื่อนไปอยู่ปลายแผ่นกระจก จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า อุณหภูมิของเจลไม่ควรสูงเกิน 60 องศาเซลเซียส
7. ถอด safety covers ออก แล้วต่อสายยางเข้ากับ drain point ให้ buffer ไหลออกมาจาก IPC plate เท buffer ที่เหลือใน IPC ทิ้ง จากนั้นถอด stabilizer bar, IPC assembly, clamp โดยเลื่อนออก แล้ววางกระจกในแนวนอน เริ่มแกะจากขอบบน

## 8. นำแผ่นเจลที่ติดอยู่กับกระจกยาว ไปย้อมด้วย silver nitrate

## การเตรียมสารละลายสำหรับ silver staining

การย้อมเจลด้วย silver nitrate มีขั้นตอน ดังนี้

## 1. Fix

100 % acetic acid	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1800	มิลลิลิตร

นำแผ่นเจลที่ได้มา fix ในสารละลายที่เตรียมไว้เป็นเวลา 20 นาทีขึ้นไป จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที หรือสังเกตจนฟองหมด

## 2. Stain

Silver nitrate	2	กรัม
37% formaldehyde	3	มิลลิลิตร

น้ำกลั่นเติมให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 2000 มิลลิลิตร

ย้อมเป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

## 3. Develop

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	60	กรัม
37% formaldehyde	3	มิลลิลิตร
Sodium thiosulfate (10มิลลิกกรัม/มิลลิลิตร)	400	ไมโครลิตร

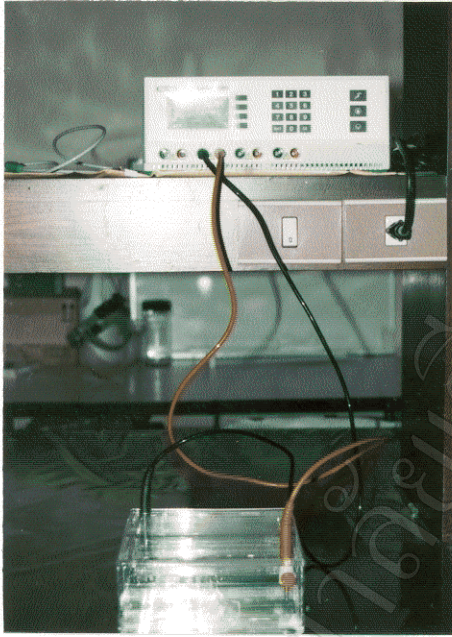
น้ำกลั่นเติมให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 2000 มิลลิลิตร

แช่เป็นเวลา 5 นาทีขึ้นไป จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย

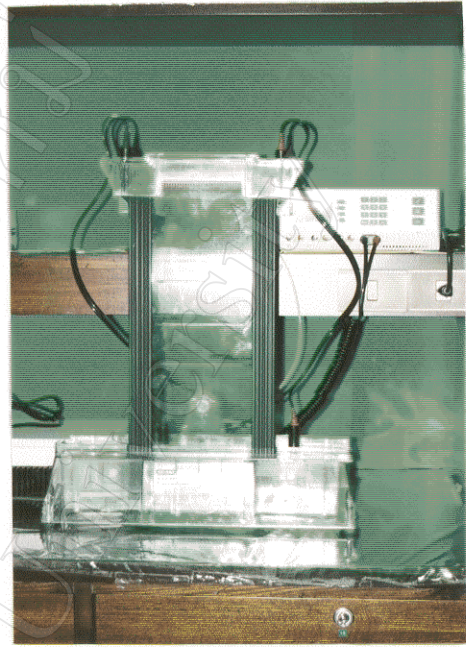
acetic acid	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1800	มิลลิลิตร

เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

## 4. บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอด้วยกล้องจุลทรรศน์



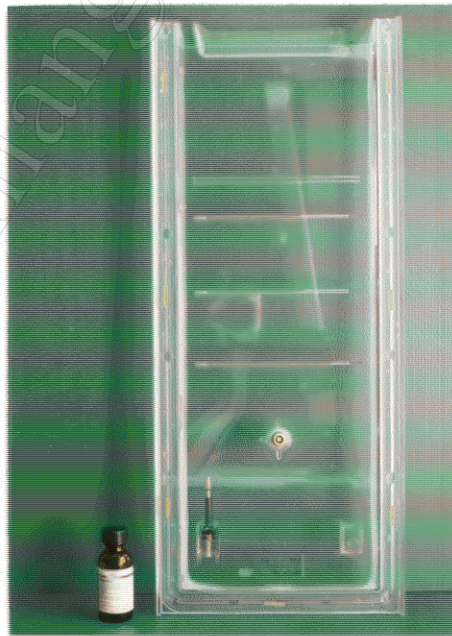
ก.



ข.

ภาพ 37 ชุดอุปกรณ์เครื่องอิเล็กทรอนิกส์

ก = ชนิดแวนอน, ข = ชนิดแนวตั้ง



ภาพ 38 การเคลือบกระจกสีด้วย sigmacoat



ภาพ 39 การเคลือบกระจกยาวด้วย bind silane



ก.



ข.

ภาพ 40 การประกอบกระจก







ตาราง 6 การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบคีเอ็นเอของบัวขี้ โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC + M-CAC

กลุ่มลักษณะสีกลีบใบประดับ ชุดที่ 2 ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบคีเอ็นเอ = 1

และปรากฏแถบคีเอ็นเอ = 0

ตำแหน่ง	ขนาด โมเลกุล	A6	A14	A15	B9	C8	E4	C9	C11	D1	E9
1	6158.24	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
2	5954.05	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
3	5889.45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	5582.34	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
5	5434.84	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
6	5131.04	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
7	5105.33	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
8	5067.83	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
9	4882.81	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	4796.42	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1
11	4587.07	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
12	4421.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	4367.32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	4270.95	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15	4121.15	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
16	3941.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17	3837.14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
18	3669.66	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
19	3447.39	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
20	3438.61	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
21	3267.63	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
22	3203.45	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
23	3010.92	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
24	2865.25	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
25	2627.09	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1













## ประวัติผู้เขียน

- ชื่อ-สกุล** นางสาว อจลีนี งอกเสมอ
- วัน เดือน ปีเกิด** 15 กรกฎาคม 2519
- ประวัติการศึกษา**
- สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนพระหฤทัย เชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัด เชียงใหม่
  - สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนมงฟอร์ตวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัด เชียงใหม่
  - สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541
- ประสบการณ์ในการทำงาน**
- งานค้ำนอญชีวโมเลกุล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541-2542
- ที่อยู่** 189/36 ถนนช้างคลาน ตำบลช้างคลาน อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100
- โทร:** (053) 279607