ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

<u>การตรวจสอบลักษณะดีเอนเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมร่างกาย</u>

<u>คู่ที่ 12 ตำแหน่ง vWA ของอาสมัครจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม</u>

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

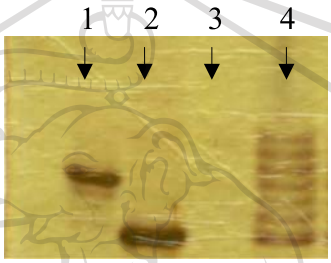
9. นำตัวอย่างที่ได้มาเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วยเทคนิค PCR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. นำมาแยกขนาดเปรียบเทียบกับอัลลีลมาตรฐานด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis

11. ตรวจดูลักษณะทางพันธุกรรม ถ้าลักษณะทางพันธุกรรมไม่มีแถบซ้อนทับกันก็จะใช้เป็นอาสาสมัครในการทดลองได้

ผลการตรวจลักษณะพันธุกรรมดีเอนเอไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง vWA ของอาสาสมัครชายและอาสาสมัครหญิงพบว่ามีลักษณะพันธุกรรมที่ไม่มีแถบซ้อนทับกันจึงใช้เป็นอาสาสมัครได้



ภาพ 5 แสดงลักษณะพันธุกรรมตำแหน่ง vWA ของอาสาสมัครชายและอาสาสมัครหญิง

โดยที่

ช่อง 1 = ตัวอย่างดีเอนเอของอาสาสมัครชาย

ช่อง 2 = ตัวอย่างดีเอนเอของอาสาสมัครหญิง

ช่อง 3 = ตัวควบคุมผลลบ (Negative control)

ช่อง 4 = อัลลีลมาตรฐานตำแหน่ง vWA ประกอบด้วย อัลลีล 14 - 20

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

<u>ขั้นตอนการย้อมเจลด้วยวิธี silver staining</u>

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

ภาคผนวก ค

ตาราง Chi-square

Probability

df	0.30	0.20	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0005
1	1.074	1.642	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879	12.116
2	2.408	3.219	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597	15.202
3	3.665	4.642	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838	17.730
4	4.878	5.989	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860	19.997
5	6.064	7.289	9.236	11.070	12.833	15.086	16.750	22.105

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

ลำดับเบสบริเวณดีเอนเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมแพศชายตำแหน่ง DYS385 ของอัลลีลที่ 11

DYS385 มีดีเอนเอตัวเริ่ม (Primers) สองตัว คือ

Forward primer: 5'GAG AAA GAG GAA AGA GAA AGA AGAG3'

Reverse primer: 5'ATC TAT TCC AAT TAC ATA GTC CTCC3'

มีลำดับเบสดังนี้

ATCTATTCCAATTACATAGTCCTCCTTTCTTTTTCTCTTTCTTTCTTTCTTTC
TTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTTC
TTTCTCTTTCCTCTTTCTCTTTCTTCTCTTTCTTTCTTTTTCTCTTTTTCTCTTT
CTTTCTTTTTTACTTTCTTTCTCCTTCCTTCCTTCCTTTCTGAATTTCATTTCT
TTTCTTTGTTGTTGTTTGGCATGGTGTCTAGCTCTGTCACCCATGCTGGATT
GCAGTGCCATCATTTCAGTTCATGACACCCTTTACATTTCAGGTTCAAACA
ATTACCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACATGCACTTGTCAAC
AGACCTGGCAAGTTTTTGTATTTTTAGTAAATAAAGGTTTTCATTATGTTG
TCCAGGCTGATCTCAAACTCCTTATCTTAAGTGATATACCCACTTTAGCCT
TCCAAATTGCTGGGATTACTGGCAAGGAC

: ช่วง Tandem repeat

ที่มา

NCBI Reference Sequence: NT_011875.12
>ref|NT_011875.12|:7002984-7003484 Homo sapiens chromosome Y genomic contig, GRCh37 reference primary assembly

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลำดับเบสบริเวณดีเอนเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมร่างกายคู่ที่ 12 ตำแหน่ง vWA ของอัลลีลที่ 10

vWA มีดีเอนเอตัวเริ่ม (Primers) สองตัว คือ

Forward primer: 5’-CCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATG-3’

Reverse primer: 5’-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3’

ลำดับเบสดังนี้

GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGGATAGATGGATAGATAGAGA
TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGACAGAC
AGACAGATAGATCAATCCAAGTCACATACTGATTATTCTTATCATCCACTA
GGGCTTTCACATCTCAGCCAAGTCAACTTGGATCCTCTAGACCTGTTTCTT
CTTCTGGAAGGTGGGAACTCTACCTTATAGGATCAGTCTGAGGAGTTCAC
AAAATAATAAGGGCAAAGTGCCCGGCACATTGTAGGAGACTAGTAATGTC
TATAAAATGAGGGGCTTGAAGTAAATGATCCCTCTAGTTCTCTCTACTGCT
AACATTCTAAGACCTCCTTTACATTAATTGTTCTCAAGCCACATCTCCCTC
CCCTACAGGACTTCTATTTATTTCTGATCAATTTCACGAGTACAAATAAGT
TTCTCCGATTATATGATTTTCTTTTAGTTCCTTGGACTGTCCCCTG

: ช่วง Tandem repeat

ที่มา

NCBI Reference Sequence: NW_001838050.1
>ref|NW_001838050.1|:500256-500756 Homo sapiens chromosome 12 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef), whole genome shotgun sequence

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นายพีรพงศ์ พลับพลา
วัน เดือน ปี เกิด	4 ธันวาคม 2517
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนหล่มสักวิทยาคม ปีการศึกษา 2535 สำเร็จการศึกษาปริญญาพยาบาลศาสตร์ วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนีสวรรค์ประชารักษ์ ปีการศึกษา 2539

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved