ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การแยกแถบดีเอ็นเอ และการย้อมดีเอ็นเอ

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 10X Taq Buffer

-	500 mM Tris pH 8.4	20.0	ml
-	2 M KCl	12.5	ml
-	150 mM MgCl2	5.0	ml
-	1% Bovine Serum Albumin	5.0	ml
-	100% Tween 20	0.25	ml
-	เติมน้ำให้ครบ	50.0	ml

2. การเตรียม 1 mM Solution of 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
-	น้ำ	960.0	µl

ผสมให้เข้ากันได้เป็นสารละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1000.0 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการแยกแถบดีเอนเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis

1. วิธีเตรียม 34% Acrylamide solution

-	Acrylamide	16.18	g
-	N,N'methylenebisacrylamide	0.81	g

เติมน้ำกลั่นลงในสารที่ชั่งเสร็จจนได้ปริมาตรเท่ากับ 50 ml

2. วิธีเตรียม 10X Gel buffer

-	ชั่ง Tris	8.0	g
-	ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายคือ	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 ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศในส่วนผสม

เทลงในชุดกระจกสำหรับเตรียมเจล ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงจึงสามารถใช้ในการแยกแถบดีเอ็นเอได้

4. วิธีเตรียม 2.5X Running buffer (Stock solution)

-	Tris	54.0	g
-	EDTA	3.73	g
-	Boric acid	27.5	g
-	ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย	2000.0	ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีเตรียม Working Solution (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 100 bp และ positive control และ negative control
- ปิดฝาครอบแล้วเปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ (Power supply)
- ใช้กระแสไฟฟ้า 90 volt นาน 16.30 ชั่วโมง
- ทำการย้อมเจลด้วย silver Staining เพื่อให้เห็นแถบดีเอ็นเอ

ขั้นตอนการย้อมเจลด้วยวิธี silver staining

1. เติม 1% Nitric acid (3 ml 65% Nitric acid + น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 200 ml) เขย่านาน 10 นาที แล้วเททิ้ง
2. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นนาน 5-10 วินาที แล้วเททิ้ง 2 ครั้ง
3. เติม 0.012M Silver nitrate solution (0.4 g Silver nitrate + น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 200 ml) เขย่านาน 35 นาที แล้วเททิ้ง
4. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นนาน 5-10 วินาที แล้วเททิ้ง 2 ครั้ง
5. เติม 0.28M Sodium carbonate และ 0.019% Formalin (11.8 g Sodium carbonate + น้ำกลั่น 390 ml แล้วเติม 37% Formalin 205 µl) ลงไปประมาณ 50 ml เมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลให้เททิ้งและเติมส่วนที่เหลือลงไป เขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอบนเจลชัดเจน แล้วเททิ้ง
6. หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid (20 ml 100% Glacial acetic acid + น้ำกลั่น 180 ml) เขย่านาน 5 นาที
7. ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 200 ml นาน 1 นาที 3 ครั้ง หรือจนหมดกลิ่นของ acetic acid
8. นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเจล (Gel dryer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ตารางค่าทางสถิติ

ตารางค่าไคสแควร์ที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐาน

df	α														
	0.99	0.95	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.0002	0.004	0.016	0.064	0.15	0.28	0.46	0.71	1.07	1.64	2.71	3.84	5.02	6.64	7.88
2	0.02	0.10	0.21	0.45	0.71	1.02	1.39	1.83	2.41	3.22	4.61	5.99	7.38	9.21	10.6
3	0.12	0.35	0.58	1.01	1.42	1.87	2.37	2.95	3.67	4.64	6.25	7.82	9.35	11.4	12.8
4	0.29	0.71	1.06	1.65	2.19	2.75	3.36	4.05	4.88	5.99	7.78	9.49	11.1	13.3	14.9
5	0.55	1.15	1.61	2.34	3.00	3.66	4.35	5.13	6.06	7.29	9.24	11.1	12.8	15.1	16.8
6	0.87	1.64	2.20	3.07	3.83	4.57	5.35	6.21	7.23	8.56	10.7	12.6	14.5	16.8	18.6
7	1.24	2.17	2.83	3.82	4.67	5.49	6.35	7.28	8.38	9.80	12.0	14.1	16.0	18.5	20.3
8	1.65	2.73	3.49	4.59	5.53	6.42	7.34	8.35	9.52	11.0	13.4	15.6	17.5	20.1	21.9
9	2.09	3.33	4.17	5.38	9.39	7.36	8.34	9.41	10.7	12.2	14.7	16.9	19.0	21.7	23.6
10	2.56	3.94	4.87	6.18	7.27	8.29	9.34	10.5	11.8	13.4	15.9	18.3	20.5	23.2	25.2
20	8.26	10.9	12.4	14.6	16.3	17.8	19.3	20.9	22.8	25.0	28.4	31.4	34.2	37.6	39.9
30	14.9	18.5	20.6	23.4	25.5	27.4	29.3	31.3	33.5	36.3	40.3	43.8	46.9	50.9	53.7
40	22.2	26.5	29.1	32.4	34.9	37.1	39.3	41.6	44.2	47.3	51.8	55.8	59.3	63.7	66.8
50	29.7	34.8	37.7	41.5	44.3	46.9	49.3	51.9	54.7	58.2	63.2	67.5	71.4	76.2	79.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นาย เขม ศรีภิรมย์
วัน เดือน ปีเกิด	16 พฤษภาคม 2529
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนปรินส์รอยแยลส์วิทยาลัย ปีการศึกษา 2547
	สำเร็จการศึกษาปริญญานิติศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved