

## APPENDIX A

### Chemical and Instruments

#### 1. Chemicals

Chemical name	Source
Acetic acid, glacial (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck, Darmstadt, Germany
Acrylamide (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO)	Bio-Rad, Richmond, CA, USA
Agarose	Bio-Rad, Richmond, CA, USA
Ammonium chloride (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt, Germany
Ammonium persulfate (NH <sub>4</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Merck, Darmstadt, Germany
Blueye prestained protein ladder	GeneDirex, Gueishan Township, TC, Taiwan
Bovine serum albumin (BSA)	Biochemical, English
Bromophenol blue (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Copper(II) Sulfate Pentahydrate (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	May & Baker, Dagenham, England
3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS)	GE-Healthcare, Amersham, England
Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA-Na <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreitol (DTT)	GE-Healthcare, Amersham, England
Ethanol, absolute (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Merck, Darmstadt, Germany
Folin-ciocalteau's phenol reagent	Merck, Darmstadt, Germany
Formaldehyde (CH <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Germany
Glycerol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Germany
Glycine (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Amresco, Solon, OH, USA
Hydrochloric acid (HCl)	LAB-SCAN, Bangkok, Thailand
Immobiline dry strip cover fluid	GE-Healthcare, Amersham, England

IPG buffer, pH 3-10	GE-Healthcare, Amersham, England
Iodoacetamide (IAA)	GE-Healthcare, Amersham, England
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Merck, Darmstadt, Germany
N, N'-methylenebisacrylamide	Merck, Darmstadt, Germany
Potassium sodium tartrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Silver nitrate (AgNO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Vivantis, Oceanside, CA, USA
Sodium hydroxide (NaOH)	LAB-SCAN, Bangkok, Thailand
Sodium thiosulphate (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Germany
TEMED	Bio-Rad, Richmond, CA, USA
Thiourea (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S)	GE-Healthcare, Amersham, England
Tris-(hydroxymethyl) aminomethane	Vivantis, Oceanside, CA, USA
Urea (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Germany

## 2. Instruments

Instruments	Source
15 ml centrifuge tube	SPL life sciences, Korea
96 well plate	SPL life sciences, Korea
Analytical balance	Mettler Toledo, Küssnacht, Switzerland
Autoclave	Tomy Seiko, Tokyo, Japan
Automatic pipette	Biohit, Finland
Automatic pipette tip	SPL life sciences, Korea
Carbon dioxide incubator	Shel Lab, OR, USA
Centrifuge	MPW med instruments, Warsaw, Poland
Cuvette	Perkin Elmer, USA
Ettan IPGphor II isoelectric focusing system	GE-Healthcare, Amersham, England

Ettan IPG strip holder	GE-Healthcare, Amersham, England
Filter paper	GE-Healthcare, Amersham, England
Hotplate stirrer	Daihan Labtech LLC, NY, USA
Immobiline dry strip gel, 7 cm, pH 3-10	GE-Healthcare, Amersham, England
Image master 2D platinum software 5.0	GE-Healthcare, Amersham, England
Image scanner III	Epson, Japan
Image scanner, UTA-1120	GE-Healthcare, Amersham, England
Light microscope	Olympus, Japan
Microcentrifuge	Eppendorf, Germany
Microplate reader	Metertech, Taipei, Taiwan
Mini-protein system (SDS-PAGE running)	Bio-Rad, Richmond, CA, USA
pH meter	E-Z-Do Company, New Jersey, USA
Power supply	E-C apparatus corporation, USA
Shaking water bath	GEL, Burgwedel, Germany
Vortex mixer	Germany industrial corporation, Taiwan
Water bath	Daihan scientific, Korea

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright© by Chiang Mai University  
 All rights reserved

## APPENDIX B

### Reagents Preparation

#### 1. Reagents for two-dimensional gel electrophoresis

##### A. Rehydration stock solution without IPG buffer

Reagents	Final concentration	Amount
Urea (FW 60.06)	8 M	4.2 g
Thiourea (FW 76.12)	2 M	1.5 g
CHAPS	4% (w/v)	0.4 g
Bromophenol blue	0.002% (w/v)	20 $\mu$ l of 1% solution E
Double-distilled water	-	to 10 ml
Store in 2.5 ml aliquots at -20 °C.		

\* DTT and IPG buffer are added immediately prior to ISE running

##### B. SDS equilibration buffer solution

Reagents	Final concentration	Amount
Urea (FW 60.06)	6 M	72.07 g
Tris-HCl, pH 8.8 (see solution H)	50 mM	10 ml
Glycerol	30% (v/v)	69 ml (84.2 g)
SDS (FW 288.38)	2% (v/v)	4.0 g
Bromophenol blue	0.002% (w/v)	400 $\mu$ l of 1% solution E
Double-distilled water	-	to 200 ml
Store in 20-or-50 ml aliquots at -20 °C.		

\* DTT and IAA are added immediately prior to IPG strip equilibration step

**C. 30% T, 2.6% C monomer stock solution**

Reagents	Final concentration	Amount
Acrylamide (FW 71.08)	30%	30.0 g
N,N'-methylenebisacrylamide (FW 154.17)	0.8%	0.8 g
Double-distilled water	-	to 100 ml
Filter solution through 0.45 $\mu$ m filter. Store at 4 °C in the dark.		

**D. 4x resolving gel buffer solution (1.5 M Tris-base, pH 8.8)**

Reagents	Final concentration	Amount
Tris-base (FW 121.1)	1.5 M	18.17 g
Double-distilled water	-	75 ml
Aqueous HCl	-	Adjust to pH 8.8
Double-distilled water	-	to 100 ml
Filter solution through 0.45 $\mu$ m filter. Store at 4 °C.		

**E. Bromophenol blue stock solution**

Reagents	Final concentration	Amount
Bromophenol blue	1%	20 mg
Tris-base	50 mM	12 mg
Double-distilled water	-	to 2 ml
Store in 1.5 ml aliquots at -20 °C		

**F. 10% SDS solution**

Reagents	Final concentration	Amount
SDS (FW 288.38)	10% (w/v)	2.0 g
Double-distilled water	-	to 20 ml
Filter solution through 0.45 $\mu$ m filter. Store at room temperature		

### G. 10% ammonium persulfate solution (APS)

Reagents	Final concentration	Amount
Ammonium persulfate (FW 228.20)	10% (w/v)	1.0 g
Double-distilled water	-	to 1 ml
Prepare just prior to use		

### H. 10x SDS electrophoresis buffer

Reagents	Final concentration	Amount
Tris-base (FW 121.1)	25 mM	30.3 g
Glycine (FW 75.07)	192 mM	144.1 g
SDS (FW 288.38)	0.1 % (w/v)	10.0 g
Double-distilled water	-	to 1 L
Store at room temperature		

\* The pH of this solution should not be adjusted.

\*\* Dilute to 1x SDS electrophoresis buffer prior to use

### I. Agarose sealing solution

Reagents	Final concentration	Amount
1xSDS electrophoresis buffer	-	50 ml
Agarose (NA or M)	0.5%	0.25 g
Bromophenol blue	0.002% (w/v)	100 $\mu$ l of 1% solution E
Add all ingredients into 25-ml Erlenmeyer flask. Swirl to disperse. Heat in a microwave oven or on a heating stirrer until the agarose is completely dissolved. Do not allow the solution to boil over. Dispense 1.5-ml aliquots into screw-cap tubes and store at room temperature		

### J. 12.5% acrylamide solution for 2-DE

Reagents	Amount
30% T, 2.6% C monomer stock solution (solution C)	4.17 ml
4x resolving gel buffer solution (solution D )	2.5 ml
10% SDS (solution F )	100 $\mu$ l
Double-distilled water	3.18 $\mu$ l
10% ammonium persulfate (APS)	50 $\mu$ l
TEMED	3.3 $\mu$

\* Ammonium persulfate and TEMED are added immediately prior to casting the gel.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## 2. Reagents for silver staining

Reagent	Solution	Amount
Fixing solution	Methanol	500 ml
	Acetic acid, glacial	120 ml
	37% Formaldehyde	500 $\mu$ l
	Distilled water to 1000 ml	
Washing solution	Absolute ethanol	350 ml
	Distilled water to 1000 ml	
Sensitizing solution (0.02%)	Sodium thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	0.2 g
	Distilled water to 1000 ml	
Silver stain solution	Silver nitrate	2 g
	Distilled water to 1000 ml	
Developing solution	Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60 g
	0.02% Sodium thiosulfate	20 ml
	37% Formaldehyde	500 $\mu$ l
	Distilled water to 1000 ml	
Stop solution	EDTA- $\text{Na}_2$	14.6 g
	Distilled water to 1000 ml	
Storing solution	Acetic acid, glacial	1 ml
	Distilled water to 1000 ml	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved



## APPENDIX C

### The Mini-Mental State Examination-Thai version 2002 score

แบบทดสอบ MMSE – Thai 2002\*

กรณีไม่ได้เรียนหนังสือ ไม่ต้องทำข้อ 4,9,10

#### 1. Orientation for time (5 คะแนน)

(ตอบถูกข้อละ 1 คะแนน)

1.1 วันนี้วันที่เท่าไร

1.2 วันนี้วันอะไร

1.3 เดือนนี้เดือนอะไร

1.4 ปีนี้ปีอะไร

1.5 ฤดูนี้ฤดูอะไร

บันทึกคำตอบไว้ทุกครั้ง

(ทั้งคำตอบที่ถูกและผิด)

คะแนน

#### 2. Orientation for place (5 คะแนน) (ให้เลือกข้อใดข้อหนึ่ง)

(ตอบถูกข้อละ 1 คะแนน)

2.1 กรณีอยู่ที่สถานพยาบาล

2.1.1 สถานที่ตรงนี้เรียกว่าอะไร และ.....ชื่อว่าอะไร

2.1.2 ขณะนี้ท่านอยู่ที่ชั้นที่เท่าไรของตัวอาคาร

2.1.3 ที่อยู่ในอำเภอ - เขตอะไร

2.1.4 ที่นี้จังหวัดอะไร

2.1.5 ที่นี้ภาคอะไร

2.2 กรณีที่อยู่ที่บ้านของผู้ถูกทดสอบ

2.2.1 สถานที่ตรงนี้เรียกว่าอะไร และบ้านเลขที่อะไร

2.2.2 ที่นี้หมู่บ้าน หรือละแวก/คุ้ม/ย่าน/ถนนอะไร

2.2.3 ที่นี้อำเภอเขต / อะไร

2.2.4 ที่นี้จังหวัดอะไร

2.2.5 ที่นี้ภาคอะไร

**3. Registraion (3 คะแนน)**

ต่อไปนี้เป็นกรทดสอบความจำ บอกชื่อสิ่งของ 3 อย่าง (บอกเพียง 1 ครั้ง ไม่มีการบอกซ้ำอีก) หลังผู้ถามพูด จบให้ผู้ถูกทดสอบ พุดทบทวนตามที่ได้ยิน ให้ครบ ทั้ง 3 (การบอกชื่อแต่ละคำให้ห่างกันประมาณหนึ่งวินาที ต้องไม่ซ้ำหรือเร็วเกินไป) (ตอบถูก 1 คำได้ 1 คะแนน)

○ ดอกไม้ ○ แม่น้ำ ○ รถไฟ .....

\*\*\* ในกรณีที่ทำแบบทดสอบซ้ำภายใน 2 เดือน ให้ใช้คำว่า

○ ต้นไม้ ○ ทะเล ○ รถยนต์ .....

**4. Attention/Calculation (5 คะแนน) (ให้เลือกข้อใดข้อหนึ่ง)**

ข้อนี้เป็นกรคิดเลขในใจเพื่อทดสอบสมาธิ ถ้าผู้ถูกทดสอบไม่สามารถคิดเลขได้ ให้ทำข้อ 4.2 แทน

4.1 ข้อนี้คิดเลขในใจเอา 100 ตั้ง ลบออกทีละ 7 ไปเรื่อยๆ ประมาณ 5 ครั้ง

บันทึกคำตอบตัวเลขไว้ทุกครั้ง .....

ถ้าลบได้ 1, 2, หรือ 3 แล้วตอบไม่ได้ ก็คิดคะแนนเท่าที่ทำได้ ไม่ต้องย้ายไปทำข้อ 4.2

4.2 สะกดคำว่า มะนาว ให้ผู้ถูกทดสอบฟัง แล้วให้ผู้ถูกทดสอบสะกดออกหลังจากพยัญชนะตัวหลังไปตัวแรก

คำว่าของคำว่า “มะนาว” การสะกด คือ มอมา-สระอะ-นอหนู-สระอา-วอแหวน

.....  
ว า น ะ ม

**5. Recall (3 คะแนน) เป็นกรถามซ้ำ โดยย้อนกลับไปถามผู้ถูกทดสอบถึงสิ่งของจาก ข้อที่ 3**

ถามผู้ถูกทดสอบถึงสิ่งของ 3 อย่าง ที่เคยถามไปเมื่อสักครู (ตอบถูก 1 คำได้ 1 คะแนน)

○ ดอกไม้ ○ แม่น้ำ ○ รถไฟ .....

\*\*\* ในกรณีที่ทำแบบทดสอบซ้ำภายใน 2 เดือน ให้ใช้คำว่า

○ ต้นไม้ ○ ทะเล ○ รถยนต์ .....

**6. Naming (2 คะแนน)**

6.1 ยื่นดินสอให้ผู้ถูกทดสอบดูแล้วถามว่า

“ของสิ่งนี้เรียกว่าอะไร” .....

6.2 ชี้นำพิกาะข้อ่มือให้ผู้ถูกทดสอบดูแล้วถามว่า

“ของสิ่งนี้เรียกว่าอะไร” .....

**7. Repetition (1 คะแนน) ทดสอบการกล่าวซ้ำ**

บอกให้ผู้ถูกทดสอบกล่าวตาม โดยบอกให้ฟังเพียงครั้งเดียว

คำที่กล่าวให้ฟัง คือ “ใครใครขายไก่ไข่” .....

**8. Verbal command** (3 คะแนน) เป็นการให้ทำตามสั่ง

บอกผู้ถูกทดสอบทำตามคำสั่ง โดยบอกเพียง 1 ครั้ง หลังจากกล่าวจบ จึงให้ผู้ถูกทดสอบปฏิบัติ  
คำสั่ง คือ “ รับกระดาษด้วยมือขวา พับครึ่งกระดาษ แล้ววางบนโต๊ะ ”

รับด้วยมือขวา  พับครึ่ง  วางไว้ที่”(พื้น, โต๊ะ, เติง) .....

**9. Written command** (1 คะแนน) เป็นการทดสอบการทำตามคำสั่งจากคำสั่งที่เขียนเป็นตัวหนังสือ

ให้ผู้ถูกทดสอบปฏิบัติตามคำสั่ง จากตัวหนังสือที่เขียนบอก

คำสั่งตัวหนังสือ คือ “ กลับตา ” ถ้าผู้ถูกทดสอบกลับตาแสดงว่าเข้าใจในคำสั่ง

กลับตาได้ .....

**10. Writing** (1 คะแนน) การทดสอบการเขียนข้อความที่เป็นประโยค

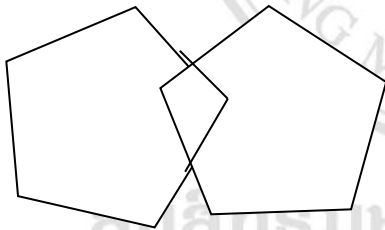
ให้ผู้ถูกทดสอบเขียนประโยค 1 ประโยคที่มีความหมาย

ประโยคมีความหมาย .....

**11. Visuoconstruction** (1 คะแนน)

ข้อนี้เป็นคำสั่ง “จงวาดภาพให้เหมือนภาพตัวอย่าง”

(ในช่องว่างด้านขวาของภาพตัวอย่าง) .....

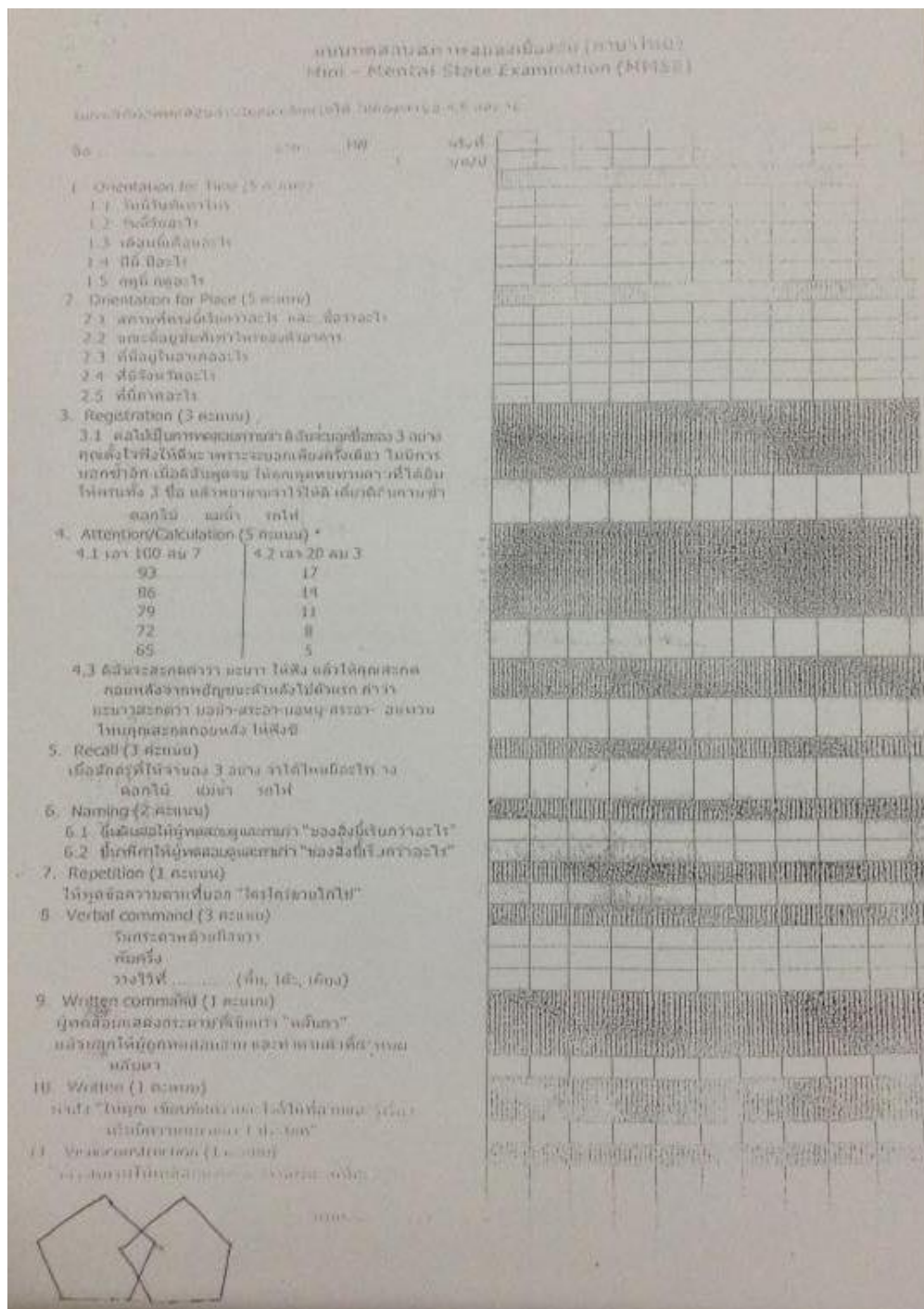


## MMSE-THAI 2002: Score

ระดับการศึกษา	คะแนน (เต็ม 30 คะแนน)		Sensitivity	Specificity	Positive Predictive value	Negative Predictive value	Efficiency
	จุดตัด	เต็ม					
ไม่ได้เรียนหนังสือ (อ่านหนังสือไม่ออก)	≤ 14	23	35.4	76.8	64.5	50.0	54.3
จบประถมศึกษา	≤ 17	30	56.6	93.8	88.9	71.0	76.3
สูงกว่าประถม	≤ 22	30	92.0	92.6	91.2	93.3	92.4

สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข แบบทดสอบสภาพสมองเสื่อมเบื้องต้น  
ต้นฉบับภาษาไทย MIMSE-THAI 2002

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved



**Figure 4.1** The Mini-Mental State Examination-Thai version 2002 (front view)

# หลับตา

MMSE-Thai 2002

ระดับการศึกษา	คะแนน	
	จุดตัด	เต็ม
ไม่ได้อ่านหนังสือ (อ่านไม่ออก เขียนไม่ได้)	≤14	23
ต่ำกว่าประถมศึกษา	≤17	30
สูงกว่าประถมศึกษา	≤22	30

สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล  
แบบทดสอบการประเมินสมองผู้สูงอายุ ฉบับภาษาไทย MMSE-Thai 2002

ในกรณีที่ผลทดสอบสูงกว่าประถมศึกษา

คะแนน	Severity of Dementia
20 - 22	mild
10 - 19	moderate
< 10	severe

Figure 4.2 The Mini-Mental State Examination-Thai version 2002 (back view)

## APPENDIX D

### Swiss-2DPAGE database

**SWISS-2DPAGE**

**Search by**  
[accession number]  
[description, ID or gene]  
[author names]  
[spot ID / serial number]  
[identification methods]  
[pI / Mw range]   
[combined fields]

**Maps**  
[experimental info]  
[protein list]  
[graphical interface]

**Select Remote Interfaces**  
 [All Interfaces]  
 World-2DPAGE Portal  
 World-2DPAGE Repository  
 Exclude local DBs  
has only effect if a remote interface is selected

**SWISS-2DPAGE**  
**Search proteins by pI/Mw range**

**pI Range:**  
min.  max.  (has no effect on SDS/1-D maps)

**Mw Range (kDaltons):**  
min.  max.

Limit to Map:

-- or type a map exact name:

--  display maps names from currently selected remote interfaces   
\* time consuming

Sort by:  Accession number  Protein ID

Please give a pI range for your spots. For example, you may type 7.25 or just 7. Give also a range for Mw in kDa. You may type, include all maps, except when you limit your search to a particular map.

**Figure 4.3** SWISS-2DPAGE searching program for proteins identification by of pI and MW which available at <http://world-2dpage.expasy.org/swiss-2dpage>.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## CURRICULUM VITAE

**Author's Name** Miss Natcha Panachamnong

**Date of Birth** August 24, 1987

**Place of Birth** Uttaradit Province, Thailand

### Education

2004 Certificate of high school, Uttaradit School,  
Uttaradit, Thailand

2009 B.S. (Medical Technology), Faculty of Associated  
Medical Science, Mahidol University,  
Nakhonpathom, Thailand

### Employment history

2009-2011 Medical Technologist, Phichai Hospital,  
Uttaradit, Thailand

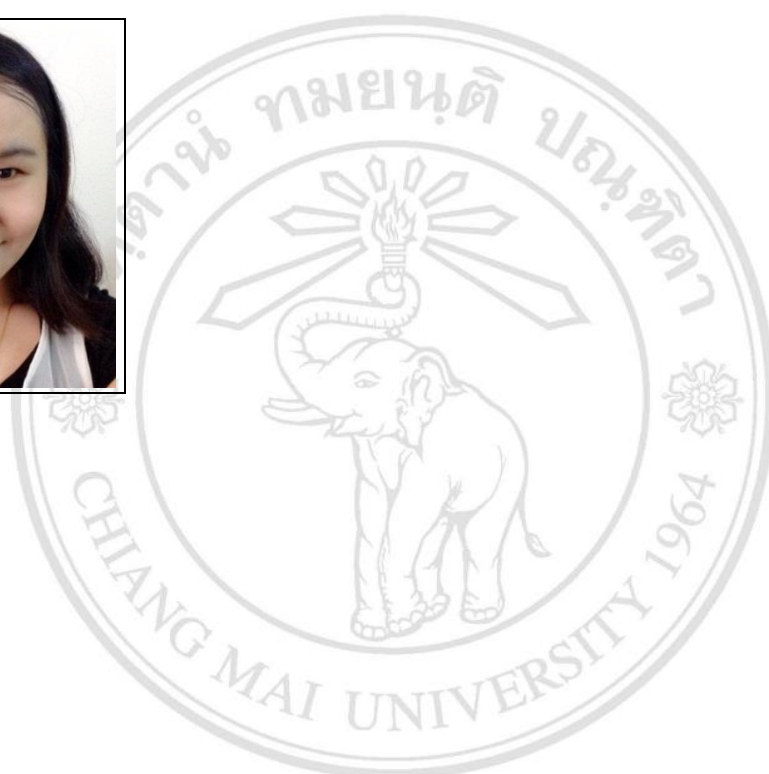
### Oral presentation

December 20, 2013 “Clusterin as a blood biomarker for diagnosis  
of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease”  
International graduate research conference 2013 (iGRC 2013),  
Conference venue at international convention center, the Empress  
hotel, Chiang Mai, Thailand.



## Publication

Panachamnong N. Methapatara P, Sungkarat S, Taneyhill K, Intasai N. Clusterin as a Blood Biomarker for Diagnosis of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. CMU J. Nat. Sci 2014;13:331-43



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved