ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ก.

วัสดุอุปกรณ์

1. Glass slide
2. เทปพลาสติกใส
3. ปากกาปลายเพชร (diamond pen)
4. 22 x 22 mm. glass coverslip
5. Fixogum
6. น้ำยาทาเล็บ
7. กระดาษฟลอยด์
8. Hot air over (Precision, Thelco, Model 18, Scientific CO.)
9. Waterbath (SHEL-LAB Model 1202)
10. Slide thermocycle (COY NO. II)
11. Thermocycle (COY NO. II)
12. Thermometer
13. Incubator (SHEL LAB)
14. pH meter (HANNA)
15. Automatic pipette (socorex swiss 1-10 µ, 20-200 µl, 1-10 ml)
16. Coplin jar
17. Humidity Petri dish
18. Microcentrifuge (IWAKI)
19. Centrifuge (ECCO)
20. Phase contrast microscope (Olympus)
21. Fluorescence microscope (Axiskop, West Germany)
22. Filter

    NO. 02 (DAPI), NO. 09 (spectrum green), NO. 15 (spectrum orange), Aqua filter set (spectrum aqua)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

23. DNA probes (CEP X spectrum orange, CEP Y spectrum green, CEP 18 spectrum aqua : p11.1 - q11.1 / CEP X spectrum green : p11.1 - q11.1 / CEP Y spectrum orange : p11.1 - q11.1, LSI 13 spectrum green : 13q14 / 21 spectrum orange 21q22.13 - q22.2)
24. AES (3-aminopropyltriethoxysilane)
25. Acetone
26. Ethanol alcohol
27. 20 XSSC
28. Ultra pure formamide
29. Deionized distilled water
30. Hybridization Buffer
31. NP-40
32. DAPI counterstain (4', 6-diamidine - 2'- Phenylindole Dihydrochloride)
33. Proteinase K
34. Glycine
35. Dithiotreitol (DTT, Sigma)
36. Lithium diiodosalicylate (LIS, Sigma)
37. Potassium chloride (Kcl)
38. Sodium chloride (NaCl)
39. Calcium chloride ($CaCl_2$)
40. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
41. Magnesium sulfate 7-hydrate ($MgSO_4$ $7H_2O$)
42. DL-Lactic acid
43. Bovine serum albumin (Sigma)
44. α D- Glucose
45. Sodium pyruvate
46. Phenol red
47. Hepes, free acid
48. Hepes (1M in 3M NaOH)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

วิธีเตรียมสารละลาย

1. Biggers-Whitten-Whittingham (Biggers, Whitten และ Whittingham, 1971)

NaCl	5.540 gm
Kcl	0.356 gm
CaCl2	0.189 gm
KH2PO4	0.162 gm
MgSO4 7H2O	0.294 gm
∝ D- Glucose	1.000 gm
Sodium pyruvate	0.028 gm
Phenol red	0.5 ml
Hepes, free acid (2M)	10.0 ml
Hepes (2M 3M NOOH)	10.0 ml
double distilled water	1 litre

ในวันที่ทำเติม Bovine serum albumin (BSA) 5%

$NaHCO_3$ 0.0632 กรัม และ D_2-Lactic acid 0.11 ml (ต่อ BWW 30 ml)

2. denature solution

Formamide 700 µl, 20 X SSC (pH 5.3) 100 µl, distilled water 200 µl ผสมให้เข้ากันดี เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ควรใช้หลังผสม 1 สัปดาห์

3. 20 X SSC

ละลาย 20 X SSC ที่บรรจุมาในขวดด้วย deionized distilled water ปรับปริมาตรได้ 250 ml ปรับ pH 5.3 ด้วย HCl เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. 2 X SSC / 0.1% NP-40

เตรียม 50 ml ของ 2 X SSC / 0.1% NP-40

นำ 2 X SSC 50 ml ผสมกับ NP-40 50 µl ผสมให้เข้ากันดี เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 0.4 X SSC / 0.3% NP-40

เตรียม 50 ml ของ 0.4 X SSC / 0.3% NP-40 นำ 0.4 X SSC (2 X SSC 10 ml ผสม deionized distilled water 40 ml) 50 ml ผสมกับ NP-40 150 µl

6. 20 µg Proteinase K / 1 PBS

เตรียม 1 ml ของ 20 µg Proteinase K / 1 PBS

นำ 1 PBS มา 1 ml ผสมกับ 20 mg Proteinase K 1 µl

7. 0.2% glycine

เตรียม 100 ml ของ 0.2% glycine

นำ glycine จำนวน 0.2 gm ผสม 1 X PBS 100 ml ฟสมให้เข้ากันดี เก็บที่ -4 องศาเซลเซียส ควรใช้หลังผสมภายใน 1 สัปดาห์

8. 70% Ethanol

เตรียม 100 ml นำ Absolute Ethanol 70 ml deionized distilled water 30 ml ผสมให้เข้ากันดี เก็บที่อุณหภูมิห้อง ควรใช้หลังผสมภายใน 1 สัปดาห์

9. 85% Ethanol

เตรียม 10 ml นำ Absolute Ethanol 85 ml ผสม deionized distill water 15 ml ผสมให้เข้ากันดี เก็บที่อุณหภูมิห้อง ควรใช้หลังผสมภายใน 1 สัปดาห์

10. Absolute Ethanol

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

11. Phosphate buffer saline (10 X PBS)

NaCl	8.0 g
Kcl	2.0 g
Na2H2PO4	14.0 g
KHPO4	2.0 g

ผสม deionized distilled water 1000 ml นำไป sterile โดย autoclave

12. Phosphate buffer saline (PBS) X 1

เตรียม 1 X PBS 100 ml นำ 10 X PBS จำนวน 10 ml ผสมกับ deionized distilled water 90 ml ผสมให้เข้ากันดี

13. 4mM DTT (dithiotreitol)

เตรียมสารละลาย 100 ml นำ 4 mM DTT 0.062 gm ผสมกับ deionized distilled water ให้เข้ากันดี เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ควรใช้หลังผสมภายใน 1 สัปดาห์

14. 10 mM lithium (lithium diiodosalicylate)

เตรียมสารละลาย 100 ml นำ lithium 0.396 gm ผสม deionized distill water 100 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ควรใช้หลังผสมภายใน 1 สัปดาห์

วิธีเตรียม AES (3-Amino propyl-triethoxysilane) เคลือบสไลด์

1. นำสไลด์ที่จะเคลือบแช่ใน cleaning sulution 3-4 ชั่วโมง หรือทิ้งข้ามคืน นำมาล้างในน้ำกลั่นให้สะอาด
2. ทิ้งสไลด์ให้แห้ง
3. จุ่มสไลด์ลงใน 2% AES ใน Acetone 1 นาที
4. จุ่มสไลด์ในข้อ 3. ใน Acetone อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
5. ทิ้งสไลด์ให้แห้ง

ภาคผนวก ข.

ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลโดย Student's t-test

จากตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซนต์ความผิดปกติของโครโมโซม 13 ของอสุจิ กลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

ตัวอย่างการคำนวณความผิดปกติแบบ disomy ระหว่างกลุ่ม Control : กลุ่ม Swim up

รายที่	control			swim up			neat		
	disomy	diploidy	total	disomy	diploidy	total	disomy	diploidy	total
3	0.049	0.049	0.098	0.066	0.000	0.066	0.097	0.048	0.145
8	0.099	0.099	0.198	0.000	0.097	0.097	0.000	0.000	0.000
9	0.148	0.099	0.247	0.147	0.000	0.147	0.000	0.098	0.098
10	0.049	0.146	0.195	0.266	0.177	0.443	0.048	0.191	0.238
11	0.000	0.280	0.280	0.044	0.265	0.309	0.096	0.144	0.240
total	0.345	0.673	1.018	0.523	0.539	1.062	0.241	0.481	0.722
เฉลี่ย	0.069	0.135	0.204	0.105	0.108	0.212	0.048	0.096	0.144

ตัวอย่างการคำนวณความผิดปกติแบบ disomy ระหว่างกลุ่ม control : กลุ่ม swim up

กลุ่ม control

$\Sigma X = 0.345$

$\Sigma X^2 = 0.119$

$\overline{X} = 0.069$

$SD^2 = 0.003$

$SD = 0.056$

กลุ่ม swim up

$\Sigma X = 0.523$

$\Sigma X^2 = 0.283$

$\overline{X} = 0.105$

$SD^2 = 0.011$

$SD = 0.105$

ทดสอบความแปรปรวน (variance) ของกลุ่มตัวอย่างทีละสองกลุ่มที่ต้องการเปรียบเทียบกันว่ามาจากประชากรกลุ่มเดียวกันหรือไม่

สูตร $$F = \frac{S_1^2 / n_1 - 1}{S_2^2 / n_2 - 1}$$

เช่น ทดสอบความผิดปกติโครโมโซม 13 แบบ disomy ของอสุจิระหว่างกลุ่ม control และ swim up

1. ตั้งสมมุติฐาน H_0 = ความแปรปรวนของทั้งสองกลุ่มเท่ากัน

   H_1 = ความแปรปรวนของทั้งสองกลุ่มไม่เท่ากัน

2. สถิติที่ใช้ $$F = \frac{S_1^2 / n_1 - 1}{S_2^2 / n_1 - 1}$$

   $df = n_1 - 1, n_2 - 1$

3. ระดับนัยสำคัญ 0.05

   จากตาราง F - distribution $F_{0.05, 4,4} = 6.39$

   อาณาเขตวิกฤต > 6.39

4. $$F = \frac{0.003/4}{0.011/4}$$

   $$= 0.333$$

   ยอมรับ H_0

นั่นคือ ข้อมูลทั้งสองกลุ่มมีการแปรปรวนเท่ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

จากข้อมูลที่ได้ ตัวอย่างของประชากรมีค่าความแปรปรวนของประชากรทั้งสองกลุ่มเท่ากัน เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความผิดปกติโครโมโซม 13 แบบ disomy ของอสุจิระหว่างกลุ่ม control และ swim up

1. กรณีค่าความแปรปรวนไม่เท่ากัน

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

2. กรณีค่าความแปรปรวนเท่ากัน

$$t = \frac{(X_1 - X_2)}{\sqrt{\frac{SP^2}{n_1} + \frac{SP^2}{n_2}}}$$

$$SP = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

จากสูตรหา $$SP = \sqrt{\frac{(5 - 1) \times .003 + (5 - 1) \times .011}{5 + 5 - 2}}$$

$$SP = \sqrt{0.007}$$

$$SP = 0.084$$

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ทดสอบค่าเฉลี่ยของความผิดปกติของโครโมโซม 13 แบบ disomy ของประชากรระหว่างกลุ่ม control และกลุ่ม swim up

1. ตั้งสมมุติฐาน H_0 = ค่าเฉลี่ยของประชากรทั้งสองกลุ่มเท่ากัน

   H_1 = ค่าเฉลี่ยของประชากรทั้งสองกลุ่มไม่เท่ากัน

2. สถิติที่ใช้ $$t = \frac{X_1 - X_2^*}{\sqrt{\frac{SP^2}{n_1} + \frac{SP^2}{n_2}}}$$

   $$df = n_1 + n_2 - 2$$

3. ระดับนัยสำคัญ 0.05

   จากตาราง Student's t distribution $t_{0.05,\ 8} = 2.306$

   อาณาเขตวิกฤต > 2.306

4. $$t = \frac{0.069 - 0.105}{\sqrt{\frac{.007}{5} + \frac{.007}{5}}}$$

   $$t = -0.755$$

นั่นคือ ค่าเฉลี่ยของความผิดปกติของโครโมโซม 13 แบบ disomy ระหว่างอสุจิกลุ่ม control และกลุ่ม swim up ไม่มีความแตกต่าง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซม 13 โดยเฉลี่ย (%) ระหว่างอสุจิกลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

ความผิดปกติ	control		swim up		neat	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
disomy	0.069	0.056	0.105	0.105	0.048	0.048
diploidy	0.135	0.088	0.108	0.115	0.096	0.076
total	0.204	0.069	0.212	0.159	0.144	0.101

ความผิดปกติของอสุจิที่เป็น disomy, diploidy และความผิดปกติทั้งหมดที่พบในกลุ่ม control, swim up และ neat ไม่แตกต่างกัน ($P > .20$)

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซม 18 โดยเฉลี่ย (%) ของอสุจิกลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

ความผิดปกติ	control		swim up		neat	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
disomy	0.036	0.050	0.063	0.141	0.054	0.038
diploidy	0.081	0.059	0.082	0.084	0.042	0.071
total	0.177	0.067	0.145	0.146	0.096	0.092

ความผิดปกติของอสุจิที่เป็น disomy, diploidy และความผิดปกติทั้งหมดที่พบในกลุ่ม control, swim up และ neat ไม่แตกต่างกัน ($P > .20$)

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซม 21 โดยเฉลี่ย (%) ระหว่างอสุจิกลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

ความผิดปกติ	control		swim up		neat	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
disomy	0.058	0.064	0.076	0.027	0.096	0.048
diploidy	0.135	0.089	0.108	0.115	0.096	0.075
total	0.193	0.118	0.192	0.113	0.202	0.102

ความผิดปกติของอสุจิที่เป็น disomy, diploidy และความผิดปกติทั้งหมดที่พบในกลุ่ม control, swim up และ neat ไม่แตกต่างกัน ($P > .20$)

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซมเพศ โดยเฉลี่ย (%) ระหว่างอสุจิกลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

ความผิดปกติ	control		swim up		neat	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
XY	0.174	0.126	0.145	0.103	0.077	0.057
XX	0.019	0.042	0.000	0.000	0.020	0.027
YY	0.019	0.042	0.019	0.026	0.020	0.044
total	0.212	0.195	0.164	0.121	0.116	0.097

ความผิดปกติของอสุจิที่นำโครโมโซม XY, XX, YY และความผิดปกติทั้งหมดที่พบในกลุ่ม control, swim up และ neat ไม่แตกต่างกัน ($P > .20$)

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนโดยเฉลี่ย (%) ของอสุจิที่นำโครโมโซม X และที่นำโครโมโซม Y ในกลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

กลุ่มอสุจิ	sperm X		sperm Y	
	X	SD	X	SD
control	47.415	2.665	46.422	1.312
swim up	46.406	2.649	46.753	1.928
neat	48.427	2.203	43.712	2.328

จำนวนอสุจิที่นำ X ต่ออสุจิที่นำ Y ในกลุ่ม control และ swim up ไม่แตกต่างกัน ($P > .20$) ในกลุ่ม neat อสุจิที่นำ X มีมากกว่าอสุจิที่นำ Y อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.02$)

ความผิดปกติของอสุจิที่เป็น disomy, diploidy และความผิดปกติทั้งหมดที่พบในกลุ่ม control, swim up และ neat ไม่แตกต่างกัน ($P > .20$)

ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลโดย X^2 contingency test

จากตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซนต์ความผิดปกติของโครโมโซม 13 ในอาสาสมัคร 5 ราย

อาสาสมัคร (รายที่)	disomy	diploidy	total
3	0.071	0.032	0.103
8	0.033	0.065	0.098
9	0.098	0.066	0.164
10	0.121	0.171	0.292
11	0.047	0.230	0.276

เปรียบเทียบความแตกต่างของโครโมโซม 13 ระหว่างรายที่ 10 กับรายที่ 8

ตั้งสมมุติฐาน H_0 = ความผิดปกติของโครโมโซม 13 ของประชากรทั้งสองเท่ากัน

H_1 = ความผิดปกติของโครโมโซมของประชากรทั้งสองไม่เท่ากัน

รายที่	ผิดปกติรวม	ปกติ	รวม
	(a)	(b)	(a + b)
10	0.292	99.708	100
	(c)	(d)	(c + d)
8	0.098	99.902	100
	(a + c)	(b + d)	(n)
	0.390	199.61	200

$$\text{สูตร} \quad X^2 = \frac{n\,[\,(a \times d) - (b \times c)\,]^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

$$\text{จากสูตร} \quad X^2 = \frac{200\,(29.171 - 9.771)^2}{100 \times 100 \times 0.390 \times 199.61}$$

$$X^2 = \frac{75272}{778479}$$

$$X^2 = 0.097$$

จากตาราง X^2 distribution

df = 1, α = .05 X^2 = 3.84

อาณาเขตวิกฤต > 3.84

นั่นคือ ค่าความผิดปกติของโครโมโซม 13 ระหว่างรายที่ 10 และรายที่ 8 ไม่มีความแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติการศึกษา

ชื่อ และ ชื่อสกุล นางสาวสิรินดา อังศุชวาล

วัน เดือน ปีเกิด 17 สิงหาคม 2506

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษาที่จบ
ประกาศนียบัตรมัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนพานพิทยาคม จังหวัดเชียงราย	2524
ประกาศนียบัตรมัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนสามัคคีวิทยาคม จังหวัดเชียงราย	2526
วท.บ. (พยาบาลและผดุงครรภ์)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่	2530

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University