



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

1. Minimum Essential Medium (MEM)

MEM*	9.5	g
NaHCO ₃	0.8	g
Gentamycin	1000	μl
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1000	ml

ผสม MEM กับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เขย่าให้ละลาย เติมน้ำ NaHCO₃ จึงนำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 μm ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงเติม gentamycin

*MEM มีส่วนประกอบดังนี้

- Earle's Balanced Salts
- 2.0 mM L-glutamine
- without sodium bicarbonate

2. Growth medium

MEM	90	ml
Inactivated fetal calf serum	10	ml

3. Maintenance medium

MEM	98	ml
Inactivated fetal calf serum	2	ml

4. Overlay medium

1.5% Sodium carboxy methylcellulose	3.5	ml
Growth medium	10.5	ml
10% NaHCO ₃	50	μl

5. Phosphate Buffer Saline (PBS, 10X)

NaCl	40	g
KCl	1	g
Na ₂ HPO ₄	5.75	g
KH ₂ PO ₄	1	g
น้ำกลั่น	500	ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. 1% Trypsin

Trypsin	1	g
ปรับปริมาตรด้วย PBS (1X) จนครบ	100	ml

แล้วจึงกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 µm เก็บที่ -20°C

7. 1% EDTA

EDTA	1	g
ปรับปริมาตรด้วย PBS (1X) จนครบ	100	ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. 10% NaHCO₃

NaHCO ₃	10	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. 1.5% Sodium carboxy methylcellulose

Sodium carboxy methylcellulose	1.5	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. 0.1% Crystal violet ใน 1% ethanol

Crystal violet	0.5	g
----------------	-----	---

95% Ethanol	5	ml
-------------	---	----

น้ำกลั่น	495	ml
----------	-----	----

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วเก็บในขวดสีชา



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

1. Lysing solution

0.25% Triton X-100	0.5	ml
0.5 M EDTA	4	ml
1 M Tris-HCl pH 8.0	2	ml
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อจนครบ	200	ml

2. 0.5 M EDTA pH 8.0

EDTA	16.86	g
น้ำกลั่น	100	ml

ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1M NaOH แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. 5 M NaCl

NaCl	29.25	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. 10% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)

SDS	10	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. 10 mg/ml Proteinase K (stock 10 mg/ml)

Proteinase K	0.01	g
--------------	------	---

เติมน้ำกลั่นมาเชื้อจนครบ	1	ml
--------------------------	---	----

ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เก็บที่ -20°C

6. 10 mg/ml RNase (stock 10mg/ml)

RNase	0.01	g
-------	------	---

เติมน้ำกลั่นมาเชื้อจนครบ	1	ml
--------------------------	---	----

ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เก็บที่ -20°C

7. phenol: chloroform: isoamyl alcohol (50: 50:1)

phenol	50	ml
--------	----	----

chloroform	50	ml
------------	----	----

isoamyl alcohol	1	ml
-----------------	---	----

ผสมในขวดสีชา ร่อนสารละลายแยกชั้น เก็บในตู้เย็น

8. chloroform: isoamyl alcohol (50: 1)

chloroform	50	ml
------------	----	----

isoamyl alcohol	1	ml
-----------------	---	----

ผสมในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น

9. 3M Sodium acetate

sodium acetate.3H ₂ O	40.83	g
----------------------------------	-------	---

น้ำกลั่น	80	ml
----------	----	----

ปรับ pH ด้วย acetic acid ให้ได้ 5.5 แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 ml นำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ใน Agarose gel electrophoresis

1. Tris-acetate buffer (TAE) 50X

Trisma base	242	g
0.5 M EDTA pH 8.0	100	ml
glacial acetic acid	57.1	ml
น้ำกลั่นจนครบ	1000	ml

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Loading buffer (5X)

50X TAE buffer	20	ml
Bromophenol blue	2	mg
Glycerol	10	ml
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนครบ	200	ml

3. Ethidium bromide

EtBr	1	g
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	100	ml

เก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ง

การสกัดแยก PCR product ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดแยกสกัด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, UK)

วิธีการแยกสกัด PCR product เพื่อให้สารมีความบริสุทธิ์

1. ตัดชิ้นเจลที่มี PCR product โดยตัดให้เจล มีขนาดกว้างประมาณ 1.5×1.5 cm หรือไม่เกิน 300 mg ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
2. เติมน้ำละลาย DF buffer ปริมาณ 500 μ l ผสมให้เข้ากันกับเจลโดยใช้ vortex mixer
3. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ $55-60^{\circ}\text{C}$ นาน 10-15 นาที โดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 2-3 นาที จนกระทั่งชิ้นเจลละลาย แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
4. เตรียม DF column ใส่ลงใน collection tube
5. นำส่วนผสมที่ได้จากข้อ 3 ปริมาณ 800 μ l ใส่ลงใน DF column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13000 rpm นาน 30 วินาที
6. เทส่วนที่เหลือใน collection tube ที่ทิ้ง และนำ DF column ใส่กลับลงใน collection tube ดังเดิม
7. เติมน้ำละลาย Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ใส่ลงใน DF column จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13000 rpm นาน 30 วินาที
8. เทส่วนที่เหลือใน collection tube ที่ทิ้ง และนำ DF column ใส่กลับลงใน collection tube ดังเดิม
9. นำมาปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13000 rpm นาน 3 นาที
10. นำ DF column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่เตรียมใหม่
11. เติมน้ำละลาย Elution buffer ปริมาตร 15-50 μ l โดยเติมลงตรงกลางของ DF column
12. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที หรือจนกระทั่งสารละลาย Elution buffer ซึมลงที่ส่วน matrix ของ DF column จนหมด
13. ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 13000 rpm นาน 2 นาที แล้วจึงเก็บสารสกัดที่ได้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ

นางสาวอ้อมหทัย ดีแท้

วัน เดือน ปีเกิด

12 มกราคม 2523

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอุตรดิตถ์ดรุณี
จ.อุตรดิตถ์ ปีการศึกษา 2540

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิค-
การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีการศึกษา 2545

ประสบการณ์

เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ ในการประชุม-
วิชาการสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 32
ประจำปี 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved