



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

การเตรียมสารละลายในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 10X Taq buffer

500 mM Tris pH 8.4	20.0	ml
2 M KCl	12.5	ml
150 mM MgCl ₂	5.0	ml
1% Bovine serum albumin	5.0	ml
100% Tween 20	0.25	ml
เติม Sterile water ให้ครบ	50.0	ml

2. การเตรียม 1 mM each 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
Sterile water	960.0	μl
ผสมให้เข้ากันได้เป็นสารละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ	1,000	μl

3. การเตรียม 1:20 Taq DNA polymerase

Taq DNA polymerase (5 U/μl)	5.0	μl
Sterile water	95.0	μl
ผสมให้เข้ากันได้เป็นสารละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ	100	μl

4. การเตรียม Human cytochrome b primers mix

Primer F (100 mM)	3.0	μl
Primer R (100 mM)	3.0	μl
เติม Sterile water ให้ครบ	100	μl

5. การเตรียม Gallus gallus cytochrome b primers mix

Primer F (100 mM)	3.0	μl
Primer R (100 mM)	3.0	μl
เติม Sterile water ให้ครบ	100	μl

การเตรียมสารละลายในกระบวนการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

1. การเตรียม 0.5X TBE buffer

Tris	5.4	g
Boric acid	2.75	g
EDTA	0.373	g
เติม Sterile water กัดันให้ครบ	1,000	ml
(รศ.อุไรวรรณ วิจารณ์กุล, 2545)		

2. การเตรียม 10X Loading dye

Bromophenol blue	0.04	g
Glycerol 85%	500.0	μl
Sterile water	500.0	μl
ผสมให้เข้ากันได้เป็นสารละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ	1,000	μl

3. การเตรียม Ethidium bromide

Ethidium bromide (10 mg/ml)	10.0	μl
0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer	200.0	ml

ผสมให้เข้ากันได้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บไว้ในที่มืด

(Ethidium bromide จะสลายตัวเมื่อโดนแสง) และระวังอย่าให้ถูกผิวหนังโดยตรง เนื่องจาก

Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) มาจากคำ 2 คำ คือ electron + phore โดย electron มาจากภาษากรีก หมายถึง อำพัน สามารถทำให้เกิดไฟฟ้าสถิตได้ และ phore มาจากภาษาละติน หมายถึง ผู้ถือ หรือ ผู้ที่มี เมื่อนำมารวมกัน จึงหมายถึง โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้า

คำว่า อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) มีการเริ่มใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ.1909 เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ก็ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่าง โมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุลบที่ PH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้น จะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ดังนี้

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (Linear) เคลี่ยวคู่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล

2. โครงแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้น ดีเอ็นเอที่มีโครงแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรงและดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด

3. เปอร์เซ็นต์ของชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลโมเลกุลของดีเอ็นเอ จะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรณีนวกลีอก คือ เจลพอลิอะครีลาไมด์ และ เจลอะกาโรส โดยเจลอะครีลาไมด์ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1,000 คู่เบส ส่วนเจลอะกาโรส ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50,000 คู่เบส

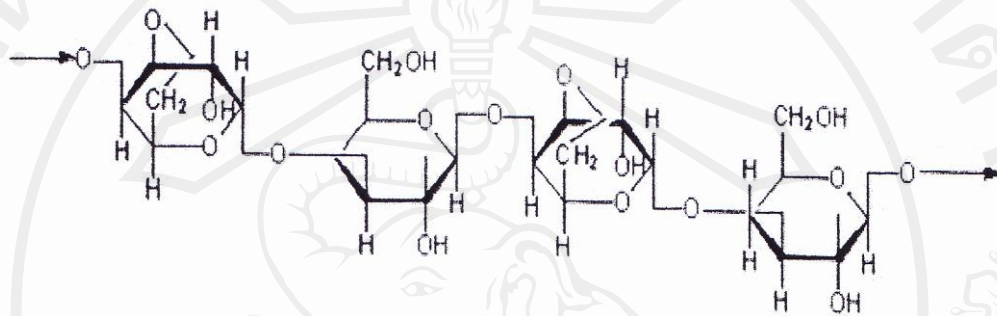
4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในการ แยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสนี้ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้ แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไป ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดีแต่ถ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ ช้าแยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TEA (Tris-acetate, EDTA), TBE (Tris- borate, EDTA), และ TPE (Tris- phosphate, EDTA) สามารถเกิดปฏิกิริยากับเจลอะกาโรสได้ มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้ เร็ว ดังนั้นการเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์

เจลอะกาโรส (Agarose gel)

เจลอะกาโรสเป็นพอลิเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3, 6-anhydrogalactose (ภาพ 11) แยกได้จากสาหร่ายทะเลเช่นเดียวกับวุ้น (Agar) องค์ประกอบหรือหน่วยย่อยโดยรวมจะเหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างกับวุ้นที่หมู่ R ที่ต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 ของน้ำตาล กาเล็คโทส โดยชื่ออะกาโรสเป็นชื่อเรียกโดยรวม จึงประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิด และ อาจมีสารประกอบอื่นเจือปน เช่น ซัลเฟต โปรตีน สารที่เจือปนนี้ถ้าเป็นสารที่มีประจุ จะทำให้เกิด เหตุการณ์ที่เรียกว่า Electroendosmosis (EEO) ซึ่งขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก เช่น ถ้ามีหมู่ที่มีประจุลบในเนื้อเจล จะทำให้โมเลกุลของน้ำที่จับตัวกับไฮโดรเจนไอออน (H_3O^+) เข้ามา เกาะกับประจุลบดังกล่าว เมื่อเปิดกระแสไฟฟ้า H_3O^+ จะถูกผลักให้เคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ ซึ่งจะสวนทางกับสารที่มีประจุลบ ขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารหรือดีเอ็นเอที่ต้องการแยก เปรียบเทียบ ได้กับการพายเรือทวนน้ำ ดังนั้น เจลอะกาโรสที่ดีควรมีค่า EEO ต่ำ ซึ่งสังเกตได้จากฉลากที่ข้างขวด นอกจากนี้การแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสบางวิธี สารพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีหมู่ซัลเฟตเหล่านี้จะติดปนมาพร้อมกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของ เอนไซม์หลายชนิด เช่น พอลิเมอร์เรส ไลเกส เอนไซม์ตัดจำเพาะ การเลือกอะกาโรสจึงต้องใช้ชนิดที่ มีความบริสุทธิ์สูงสำหรับใช้ในงานระดับโมเลกุล โดยทั่วไปต้องใช้อุณหภูมิ 80 - 90 องศาเซลเซียส

จึงจะหลอมละลายได้ และจะแข็งตัวที่อุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส ส่วนอะกาโรสชนิดที่หลอมได้ที่อุณหภูมิต่ำเกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซีเอทิล เข้าไปในสายพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้สามารถหลอมได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และไม่ทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอเสียสภาพ



ภาพ 11 โครงสร้างทางเคมีของอะกาโรส ที่แสดงโมเลกุล

D-galactose สลับกับ 3,6-anhydro L-galactose

(ที่มา: สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

โดยทั่วไปดีเอ็นเอที่สกัดได้จะนำมาวิเคราะห์หาคุณภาพและปริมาณความเข้มข้นด้วยวิธีการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว สามารถคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นและตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ โดยนำไปเทียบกับ 100 bp DNA ladder ที่ทราบความเข้มข้นอยู่แล้ว (จุฑารัตน์ ประภารัตนะพันธุ์, 2548)

ดีเอ็นเอจะสามารถเคลื่อนผ่านบนเจลอะกาโรสได้ด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งดีเอ็นเอมีประจุเป็นลบ จะเคลื่อนตัวจากขั้วลบไปทางขั้วบวก และเคลื่อนไปตามขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าวจะใช้ปริมาณความเข้มข้นของเจลอะกาโรสระหว่าง 0.5 - 6.0 % (w/v) ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ (ตาราง 4) ประกอบกับการใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ตาราง 4 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยเจลอะกาโรส
(ที่มา: สุรินทร์ ปิยะ โขคนากุล, 2552)

ความเข้มข้นของเจล (%)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
0.3	5,000 - 60,000
0.6	1,000 - 20,000
0.7	800 - 10,000
0.9	500 - 7,000
1.2	400 - 6,000
1.5	200 - 4,000
2.0	100 - 3,000

ขั้นตอนการทำ Agarose Gel Electrophoresis

1. เตรียม 2% Agarose gel โดยชั่ง Agarose powder 0.8 g. เทใส่บีกเกอร์ แล้วเติม 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) Buffer 40 ml นำไปต้มเพื่อให้ Agarose powder ละลาย ที่อุณหภูมิ 60 °C ใช้ Magnetic stirrer คนผสมสารให้เข้ากัน จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทใส่ถาดเจลที่วางบนพื้นเรียบ แล้วเสียบหัวสำหรับสร้างหลุม 13 หลุม ลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล ให้หัวอยู่ห่างจากปลายของเจล ประมาณ 1 cm. แล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ประมาณ 1-2 ชั่วโมง

2. หลังจากเจลแข็งตัว ค่อยๆดึงหัวออก นำถาดเจลไปวางไว้ในเครื่อง Agarose electrophoresis

3. วางถาดเจลที่เตรียมไว้ลงในเครื่องแล้วเติม 0.5X TBE buffer ให้ท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 mm.

4. ผสมผลิตภัณฑ์ฟิซีอาร์กับสีย้อม>Loading dyes) 1 µl ต่อ 1 หลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยง ประมาณ 30 วินาที แล้วหยอดผลิตภัณฑ์ฟิซีอาร์ที่ผสมสีย้อมแล้วลงในหลุมเจล โดยใช้ Micropipette และเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

5. หยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder 5 µl, Positive control, Negative control และผลิตภัณฑ์ฟิซีอาร์อย่างละ 5 µl ลงในหลุมเจล

6. เมื่อหยอดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เรียบร้อยแล้ว ปิดฝาครอบเครื่อง Agarose electrophoresis แล้วปรับตั้งค่าเครื่อง โดยใช้ 100 V 50 mA เป็นเวลา 25 นาที
7. เมื่อครบเวลา จึงนำแผ่นเจลออกมา แช่ในสารละลาย Ethidium bromide นาน 30 นาที
8. นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Ultraviolet visible transilluminator เพื่อตรวจสอบผล

หมายเหตุ การตรวจสอบดีเอ็นเอหลังจากการทำอิเล็กโตโฟริซิสด้วยการย้อมเจลโดยสีเรืองแสง สีเหล่านี้เมื่ออยู่อย่างอิสระในสารละลายจะเรืองแสงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ถ้าจับตัวกับดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ จะเรืองแสงเพิ่มขึ้นมาก เช่น เอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งเป็นสีที่จะสอดแทรกตัวเข้าไปอยู่ระหว่างชั้นของคู่เบส (Intercalating dye) แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 10 เท่า สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอและเอธิเดียมโบรไมด์จะดูดแสงอัลตราไวโอเล็ตเกิด excitation และปล่อยพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งจะเห็นเป็นสีแดงส้ม หลอดแสงอัลตราไวโอเล็ตในเครื่องถ่ายภาพเจลบางรุ่น จะให้แสงที่มีความยาวคลื่นถึง 3 ความยาวคลื่น คือ 254, 302 และ 366 นาโนเมตร แสงที่มีความยาวคลื่นต่ำจะมีพลังงานสูงกว่าและทำให้เกิดการเรืองแสงได้ดีกว่า ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนกว่าแต่ก็มีผลทำให้เกิดพิษของดีเอ็นเอมากกว่าด้วย จึงไม่เหมาะสมถ้าต้องการแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากเจลเพื่อนำไปใช้ต่อ แต่ถ้าต้องการตรวจดูอย่างเดียว หรือต้องการย้ายจากเจลไปบนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (Blotting) การขาดของสายดีเอ็นเอจะช่วยให้การย้ายจากเจลมีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยทั่วไปนิยมใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร เพราะไม่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหายมากนัก แม้ว่าการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์หรือสีเรืองแสงที่ใช้จะลดลงบ้าง

ภาคผนวก ก

ลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของมนุษย์ ในยีนไซโตโครม บี บนไมโทคอนเดรีย

Human cytochrome b gene มี Primer เริ่มต้น 2 ตัวคือ

Primer F : 5' –TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT- 3'

Primer R : 3' –ACTTGTCCAATGATGGTAAAAGG- 3'

โดยมีลำดับเบสดังนี้

TTCTCACCAGACCTCCTAGGCGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAAC
ACCCCTCCCCACATCAAGCCCGAATGATATTTCTATTTCGCCTACACAATTCTCCGAT
CCGTCCCTAACAACACTAGGAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCTAGC
AATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATATTTGCCCCACTAAG
CCAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGCAGACCTCCTCATTCTAACCTGAATCGGAGGA
CAACAGTAAGCTACCCTTTTACCATCATTGGACAAGTAGCATCCGTACTATACTTCA
CAACAATCCTAATCCTAATACCAACTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAAT
GGGCCTGTCCTTGTAAGTATAAACTAATACACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAAAAC
CTTTTCCAAGGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAG
CTAAGATTCTAATTTAACTATTCTCTGTTCTTTCATGGGGAAGCAGATTGTTGGGTACC
ACCCAAGTATTGACTCACCCATCAA

ที่มา NCBI Reference Sequence: NC_001807 (15648-15804)

> ref|NC_012920.1|Homo sapiens mitochondrion, complete genome, Length=16569

ลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของไก่ ในยีนไซโตโครม บี บนไมโทคอนเดรีย

Gallus gallus cytochrome b gene มี Primer เริ่มต้น 2 ตัวคือ

Primer F : 5' –GCCCCATCCAACATCTCTGC- 3'

Primer R : 5' –GGAGATTCCGGATGAGTCAG- 3'

โดยมีลำดับเบสดังนี้

AACTCCCTAATCGACCTCCCAGCCCCATCCAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTCGGCT
CCCTATTAGCAGTCTGCCTCATGACCCAAATCCTCACC GGCC TACTACTAGCCATGCA
CTACACAGCAGACACATCCCTAGCCTTCTCCTCCGTAGCCCACACTTGCCGGAACGT
AACAAACACGGCTGACTCATCCGGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCAT
CTGTATCTTC

ที่มา NCBI Reference Sequence: NC_001323.1 (14962 – 15142 = 181 bp)

ref[NC_001323.1| Gallus gallus mitochondrion, complete genome, Length=16775

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001323.1?report=GenBank

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล

นางสาวนันทา ทองวินิจศิลป์

วัน เดือน ปี เกิด

10 พฤศจิกายน 2526

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย

โรงเรียนลำปางกัลยาณี

จังหวัดลำปาง ปีการศึกษา 2543

สำเร็จการศึกษา นิติศาสตรบัณฑิต

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved