



ภาคผนวก ก

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
เติมน้ำให้ครบ	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
น้ำ	960.0	μl

ผสมให้เข้ากันได้เป็นสารละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1000.0 μl

3. การเตรียม Sus Scrofa Cytochrome b primer mix

Primer F (100 mM)	5	μl
Primer R (100 mM)	5	μl
เติมน้ำให้ครบ	100	μl

4. การเตรียม Homo sapiens Cytochrome b primer mix

Primer F (100 mM)	3	μl
Primer R (100 mM)	3	μl
เติมน้ำให้ครบ	100	μl

5. การเตรียม 0.5X TBE buffer

Tris	5.4	g
Boric acid	2.75	g
EDTA	0.373	g
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	ml
(รศ.อุไรวรรณ วิจารณ์กุล, 2545)		

6. วิธีเตรียมสารละลาย Ethidium bromide

Ethidium bromide	10	μl
0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) buffer	200	ml

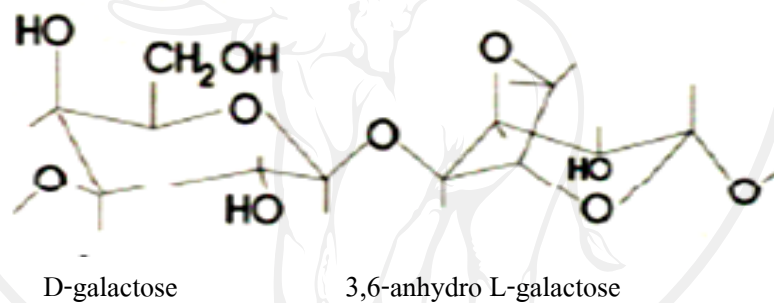
เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในที่มืด

(ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังโดยตรง เนื่องจาก Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง)

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

เจลอะกาโรส



ภาพ 14 สูตรโครงสร้างของ Agarose

ที่มา (Sambrook et al., 1989, p. 6.3)

เจลอะกาโรสเป็นพอลิเมอร์ของ **D-galactose** สลับกับ **3, 6-anhydrogalactose** แยกได้จากสาหร่ายทะเลเช่นเดียวกับวุ้น (Agar) องค์ประกอบหรือหน่วยย่อยโดยรวมจะเหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างกับวุ้นที่หมู่ R ที่ต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 ของน้ำตาลกลีโคโทส โดยชื่อ Agarose เป็นชื่อเรียกโดยรวม จึงประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิด และอาจมีสารประกอบอื่นเจือปน เช่น ซัลเฟต โปรตีน สารที่เจือปนนี้ถ้าเป็นสารที่มีประจุ จะทำให้เกิดเหตุการณ์ที่เรียกว่า Electroendosmosis (EEO) ซึ่งขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก เช่น ถ้ามีหมู่ที่มีประจุลบในเนื้อเจล จะทำให้โมเลกุลของน้ำที่จับตัวกับไฮโดรเจนไอออน (H_3O^+) เข้ามาเกาะกับประจุลบดังกล่าว เมื่อเปิดกระแสไฟฟ้า H_3O^+ จะถูกผลักให้เคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ ซึ่งจะสวนทางกับสารที่มีประจุลบ ขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารหรือดีเอ็นเอที่ต้องการแยก เปรียบเทียบได้กับ

การพายเรือทวนน้ำ ดังนั้น Agarose gel ที่ดีควรมีค่า EEO ต่ำ ซึ่งสังเกตได้จากฉลากที่ข้างขวด นอกจากนี้การแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลอะกาโรสบางวิธี สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ซัลเฟตเหล่านี้จะติดปนมาพร้อมกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ และเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายชนิด เช่น พอลิเมอร์เรส ไลเกส เอนไซม์ตัดจำเพาะ การเลือกอะกาโรสจึงต้องใช้ชนิดที่มีความบริสุทธิ์สูงสำหรับใช้ในงานระดับโมเลกุล

อิเล็กโตโฟริซิส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ก็ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง โมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย

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

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (Linear) เคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอที่ไคร้จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล
2. โครงแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้น ดีเอ็นเอที่มีโครงแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด
3. เพอร์เซ็นต์ของชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิก คือ Acrylamide gel และ Agarose gel โดย Acrylamide gel ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1,000 คู่เบส ส่วน Agarose gel ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50,000 คู่เบส

ตาราง 4 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดย Agarose gel

ความเข้มข้นของ gel (%)	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

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสนี้ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไป ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี แต่ถ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าแยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

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

ภาคผนวก ก

ลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของสุกรในส่วนของยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

Sub scrofa Cytochrome b gene มี Primer เริ่มต้น 2 ตัวคือ

Primer Forward: 5' -AATCTTGCAAATCCTAACAGGCC- 3'

Primer Reverse: 5' -CCGTTTGCATGTAGATAGCGAAT- 3'

โดยมีลำดับเบสดังนี้

atgaccaaca tccgaaaatc acaccacta ataaaaatta tcaacaacgc attcattgac
ctcccagccc cctcaaacat ctcatcatga tgaaacttcg gtccctctt aggcattctgc
ctaaatcttgc aaatcctaac aggcctgttc ttagcaatac attacacatc agacacaaca
acagctttct catcagttac acacatttgt cgagacgtaa attacggatg agtattcgc
tatctacatg caaacggagc atccatattc tttatttgcc tattcatcca cgtaggccga
ggcttatact acggatccta tatattccta gaaacatgaa acattggagt agtctacta
tttaccgtta tagcaacagc cttcataggc tacgtctgc cctgaggaca aatatcattc
tgaggagcta cgggtcatcac aaatctacta tcagctatcc cttatatcgg aacagacctc
gtagaatgaa tctgaggggg cttttccgtc gacaaagcaa ccctcacacg attcttcgcc
ttccacttta tctgccatt catcattacc gccctcgcag ccgtacatct catattcctg
cacgaaaccg gatccaacaa ccctaccgga atctcatcag acatagacaa aatccattt
cacccatact aactattaa agacattcta ggagccttat ttataatact aatcctacta
atcctgttac tattctcacc agacctacta ggagaccag acaactacac cccagcaaac
ccactaaaca cccacccca tattaacca gaatgatatt tcttatcgc ctacgctatt
ctacgttcaa ttctaataa actaggtgga gtgttgccc tagtagcctc catcctaac
ctaattttaa tgccatact gcacacatcc aaacaacgag gcataatatt tcgaccacta
agtcaatgcc tattctgaat actagtagca gacctatta cactaacatg aattggagga
caaccgtag aacaccggtt catcatcatc ggccaactag cctccatctt atacttcta
atcattctag tattgatacc aatcactagc atcatcgaaa acaacctatt aaaatgaaga

ที่มา <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X56295>

S.scrofa mitochondrion cytb gene for cytochrome b

GenBank: X56295.

ลำดับเบสบริเวณดีเอ็นเอของมนุษย์ในส่วนของยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

Human Cytochrome b gene มี Primer เริ่มต้น 2 ตัวคือ

Primer F : 5' –TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT- 3'

Primer R : 3' –ACTTGTCCAATGATGGTAAAAGG- 3'

โดยมีลำดับเบสดังนี้

ttctcaccag acctcctagg cgacccagac aattataccc tagccaaccc cttaaacacc
cctccccaca tcaagcccga atgatatttc ctattcgcct acacaattct ccgatccgtc
cctaacaaac taggaggcgt ccttgcccta ttactatcca tctcctcct agcaataatc
cccatcctcc atatatccaa acaacaaagc ataatatc gcccactaag ccaatcactt
tattgactcc tagccgcaga cctcctcatt ctaacctgaa tcggaggaca acagtaagct
ac ccttttac catcattgga caagtagcat ccgtactata cttcacaaca atcctaacc
taataccaac tatctccta attgaaaaca aaatactcaa atgggcctgt ccttgtagta
taaactaata caccagtctt gtaaaccgga gatgaaaacc ttttccaag gacaaatcag
agaaaaagtc ttaactcca ccattagcac ccaaagctaa gattctaatt taaactattc
tctgttcttt catggggaag cagatttggg taccaccaa gtattgactc acccatcaa

ที่มา NCBI Reference Sequence: NC_001807 (15648-15804)

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

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล

นายภาณุวัฒน์ อ่อนอินทร์

วัน เดือน ปี เกิด

19 มีนาคม 2531

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ
สวนกุหลาบวิทยาลัยปทุมธานี
ปีการศึกษา 2548

สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต(วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)
มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2552