ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Salt Extraction

สารเคมี

1. Protenase K (20 mg/ l)
   - 1.1 1 M Tris HCl 10 µl
   - 1.2 1 M $CaCl_2$ 20 µl
   - 1.3 H_2O 470 µl
   - 1.4 Glycerol 500 µl
   - 1.5 Proteinase K 0.02 mg
2. Lysis Buffer
   - 2.1 100 mM Tris HCl 5 ml
   - 2.2 100 mM EDTA 10 ml
   - 2.3 0.5% SDS 0.25 g
   - 2.4 0.2 M NaCl 0.58 g
3. 7.5 M Amminuim Acetate
4. Isopropanol 100%
5. Ethanol 70%
6. TE
   - 6.1 1 M Tris base pH 8.0
   - 6.2 0.5 M EDTA pH 8.0

วิธีการ ดัดแปลงจาก Aljanabi and Martinez (1994)

1. เขียนชื่อ ตัวอย่าง วันที่ และชื่อผู้เตรียมตัวอย่างลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

2. คำนวณปริมาตร Lysis Buffer และสารละลาย Protenase K ที่ต้องการ โดยในแต่ละหลอดใช้ Lysis Buffer 500 µl และ Protenase K (20 mg/ l) 10 µl

3. ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ในหลอด Microcentrifuge ที่มี Lysis Buffer และ Protenase K เพื่อย่อยเนื้อเยื่อ

4. Incubate ตัวอย่าง และ Lysis Buffer ใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือ 55 องศาเซลเซียส โดยทิ้งไว้ข้ามคืน (7-8 ชั่วโมง)

5. หลังจากนั้น รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. เติม 7.5 M Ammonium Acetate 150 µl ในหลอดตัวอย่าง

7. ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (14000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 3-5 นาที เพื่อให้โปรตีนที่ย่อยแล้วตกตะกอน

8. ดูดส่วนใสที่แขวนลอยอยู่ส่วนบนไปใส่ในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml อันใหม่

9. เติม Isopropanol 100% แช่เย็น ปริมาตร 450 µl ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าไปมา 50 ครั้ง เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

10. ใส่ตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แช่ไว้ 1 ชั่วโมง

11. ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (14000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 3-5 นาที

12. เท Isopropanol 100% ทิ้ง ประมาณ 400-600 µl เติม Ethanol 70% ปริมาตร 1 ml

13. ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าไปมา ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (14000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 1 นาที

14. ค่อย ๆ เท Ethanol 70% ทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนขาวที่ก้นหลอดหลุดไปด้วย

15. ปล่อยให้ตกตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

16. เติม TE 100 µl เพื่อให้ละลายตะกอนขาว และ Incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

17. วัดปริมาณดีเอ็นเอ

การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Agarose Gel Electrophoresis

สารเคมี

1. Agarose Gel
2. TBE
   - 2.1 Tris Ultra Pure
   - 2.2 Boric Acid
   - 2.3 0.5 M EDTA, pH 8.0
3. Ethedium Bromide

วิธีการ ดัดแปลงจาก BIORAD Laboratories (2000)

1. ผสม Agrose Gel 1% (w/ v ใช้ Buffer TBE เป็นตัวทำละลาย) ในบีกเกอร์ ขนาด 80 ml

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. อุ่นสารละลาย Gel ใน Microwave ประมาณ 45 วินาที

3. รอประมาณ 30 วินาที เพื่อให้สารละลาย Gel ไม่ร้อนจัด

4. เทลงในที่ Cast Gel

5. รอให้ Gel แข็งตัว (ประมาณ 15 นาที)

6. เตรียมสารละลายดีเอ็นเอ และ Molecular Weight Standard โดยใส่ Loading Dye 10% DNA 3 µl + Dye 1 µl

7. Load สารละลาย DNA ใส่ในแต่ละ Well ปริมาณ 4 µl ต้อง Load Molecular Weight Standard เสมอ Standard 50 bp ใส่ DNA 3 µl + Dye 1 µl

8. ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 70 โวลท์ เป็นเวลา 45 นาที

9. นำ Gel ที่ได้มาย้อม Ethedium Bromide เป็นเวลา 10 นาที

10. นำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง UV Transluminator

11. บันทึกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ และสัดส่วนความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับปริมาตรที่แน่นอน

การตรวจสอบ PCR Product ด้วย Gel Acrylamide แบบสั้น

การเตรียมกระจกแผ่นใหญ่

สารเคมี

Binding solution

Ethanol 95%	49.75 ml
Glacial Acetic Acid	0.25 ml

*เวลาใช้นำ Binding Solution 1 ml มาผสมกับ Glass Bond 3 µl

วิธีการ

1. ทาน้ำยา ให้ทั่วทิ้งไว้ 4-5 นาที

2. ล้างด้วย Ethanol 70% โดยเช็ดในแนวตั้ง และเช็ดตามแนวนอน

3. รอจนกระจกแห้ง

การเตรียมกระจกแผ่นเล็ก

สารเคมี

น้ำยากันฝ้า

วิธีการ

1. ทาน้ำยากันฝ้า โดยเช็ดเป็นวงกลมให้ขึ้นฝ้า 2 ครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. เช็ดออกด้วยกระดาษทิชชู่เปล่า

การเตรียม Gel

สารเคมี

Acrylamide Gel (8%)	12 ml
7M Urea	25.2 g
10XTBE	6 ml
Temed	40 µl
Amps (25%)	125 µl * ใช้ Amps 0.05 g+น้ำกลั่น 200 µl
น้ำกลั่น	22 ml

วิธีการ ดัดแปลงจาก BIORAD Laboratories (2000)

1. ประกบกระจกแผ่นใหญ่กับกระจกแผ่นเล็ก แล้วคั่นด้วย Spacer เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับ Gel

2. เท Gel ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วลงในระหว่างกระจกแผ่นเล็ก และแผ่นใหญ่

3. ใส่ Comb ที่แผ่นกระจก รอให้ Gel แข็ง จากกระบวนการ Polymerization ประมาณ 20 นาที

4. เมื่อ Gel แข็งตัวแล้ว นำ Comb ออก และนำแผ่นกระจกไปประกอบกับชุด Gel Electrophoresis

5. เติมบัฟเฟอร์ 1XTBE ลงใน Gel Electrophoresis ทั้งด้านใน และด้านนอก เพื่อเป็นตัวกลางในการนำไฟฟ้า

6. นำ Autopipette มาดูดบริเวณขอบกระจกตลอดให้ทั่วทั้งแผ่น เพื่อให้สิ่งสกปรกหลุดออก

7. ดึงแผ่น Comb ออกอย่างระมัดระวัง

8. เตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการ Load Standard ใช้ปริมาณ DNA + Dye 50% Load ช่องละ 3 µl

9. Load DNA + Dye โดยเปลี่ยน Tip ในทุก Primer

10. ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 250 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การตรวจสอบ PCR Product ด้วย Gel Acrylamide แบบยาว

การเตรียมกระจกแผ่นใหญ่

สารเคมี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Binding Solution

Ethanol 95%	49.75 ml
Glacial Acetic Acid	0.25 ml

* เวลาใช้นำ Binding Solution 1 ml มาผสมกับ Glass Bond 3 µl

วิธีการ

1. ทาน้ำยา ให้ทั่วทิ้งไว้ 4-5 นาที
2. ล้างด้วย Ethanol 70% โดยเช็ดในแนวตั้ง และเช็ดตามแนวนอน
3. รอจนกระจกแห้ง

การเตรียมกระจกแผ่นเล็ก

สารเคมี

น้ำยากันฝ้า

วิธีการ

1. ทาน้ำยากันฝ้า โดยเช็ดเป็นวงกลมให้ขึ้นฝ้า 2 ครั้ง
2. เช็ดออกด้วยกระดาษทิชชู่เปล่า

การเตรียม Gel

สารเคมี

Acrylamide Gel (8%)	8.6	ml
7M Urea	5.2	g
10XTBE	8	ml
Temed	70	µl
Amps (25%)	210	µl * ใช้ Amps 0.05 g+น้ำกลั่น 200 µl
น้ำกลั่น	43.4	ml

วิธีการ ดัดแปลงจาก BIORAD Laboratories (2000)

1. ประกบกระจกแผ่นใหญ่กับกระจกแผ่นเล็ก แล้วคั่นด้วย Spacer เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับ Gel
2. ปิดช่องว่างบริเวณขอบกระจกทั้งด้านซ้าย ด้านขวา และด้านล่างด้วยสก๊อตเทป
3. เท Gel ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วลงระหว่างกระจกแผ่นใหญ่ และแผ่นเล็ก
3. ใส่ Comb ที่แผ่นกระจก รอให้ Gel แข็ง จากกระบวนการ Polymerization ประมาณ 1 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. เมื่อ Gel แข็งตัวแล้ว นำ Comb ออก และนำแผ่นกระจกไปประกอบกับชุด Gel Electrophoresis

5. เติมบัฟเฟอร์ 1XTBE ลงใน Gel Electrophoresis ทั้งด้านล่าง และด้านบน เพื่อเป็นตัวกลางในการนำไฟฟ้า

6. นำ Autopipette มาดูดบริเวณขอบกระจกตลอดให้ทั่วทั้งแผ่น เพื่อให้สิ่งสกปรกหลุดออก

7. ใส่แผ่น Comb ให้ทิ่ม Gel ลงไปเล็กน้อย

8. Warm Gel โดยการเปิดเครื่อง 30 นาที

9. เตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการ Load ก่อน Load โดยนำ DNA ไป Denature ให้ DNA แยกเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

10. Standard ใช้ปริมาณ DNA + Dye 50% Load ช่องละ 2 µl

11. Load DNA + Dye โดยเปลี่ยน Tip ในทุก Primer

12. ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 1200 โวลท์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจดูตำแหน่ง Dye และความเรียบร้อยทุก ๆ 30 นาที

การย้อม Gel ด้วยวิธี Silver Staining

สารเคมี

1. Fix/ Stop Solution

1.1 Glacial Acetic Acid 10%	100	ml
1.2 Water	900	ml

2. Staining Solution (แช่เย็น)

2.1 Silver Nitrate	1	g
2.2 Formaldehyde 37%	1.5	ml
2.3 Water	1	lite

3. Developing Solution* (แช่เย็น)

3.1 Sodium Carbonate	30	g
3.2 Water	1	lite

* ก่อนใช้เติม Formaldehyde 37% 1.5 ml และ Sodium Thiosulfate 200 µl

วิธีการ ดัดแปลงจาก Promega Co. Ltd. (2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. หลังจากกระบวนการ Electrophoresis แยกแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน โดย Gel จะติดอยู่กับกระจกแผ่นใหญ่

2. วางกระจกแผ่นใหญ่ลงในถังเพื่อ Fix Gel ที่ติดกับกระจก ด้วย Fix/stop Solution (Acetic Acid) เป็นเวลา 20 นาที เก็บ Fix/ Stop Solution (Acetic Acid) ที่ใช้แล้วเพื่อนำมาใช้หยุดปฏิกิริยา (ในขั้นตอนที่ 7)

3. ล้างแผ่น Gel ด้วย น้ำ 3 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ยกแผ่น Gel ขึ้นเพื่อให้น้ำไหลลงเป็นเวลา 10-20 วินาที

4. ย้อมแผ่น Gel ด้วย Staining Solution (Silver Nitrate) เป็นเวลา 30 นาที

5. ล้างแผ่น Gel ด้วย น้ำ 5-10 วินาที

6. Develop Gel ที่ติดกับกระจก ด้วย Developing Solution (Sodium Carbonate) 1 ลิตร

7. หยุดกระบวนการ Develop ด้วย Acetic Acid 1 ลิตร (จากขั้นตอนที่ 2) เป็นเวลา 2-3 นาที

8. ล้างแผ่น Gel ด้วย น้ำ 5-10 วินาที

9. ผึ่งให้ Gel แห้ง แล้วสังเกตแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

การทำ Sequencing

สารเคมี

1. d/ ddNTP Mix (AGCT)
2. pGEM-3Zf(+)
3. DNA Sequencing 5X Buffer
4. pUC/ M13 Forward Primer
5. Nuclease-Free Water
6. *Taq* DNA Polymerase

วิธีการ ดัดแปลงจาก Promega Co. Ltd. (2006)

1. เขียนตัวอย่าง ที่หลอด Microcentrifuge 0.5 ml (A, G, C, T)

2. เติม d/ ddNTP Mix ในแต่ละหลอด หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียม Mastermix (Primer/ Template Mix) ดังนี้

2.1 pGEM-3Zf (+) (4μg)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 DNA Sequencing 5X Buffer

2.3 pUC/ M13 Forward Primer (5pmol)

2.4 Nuclease-Free Water to Final Volume

3. เติม 1µl ของ Sequencing Grade *Taq* DNA Polymerase (5u/ µl) ลงในหลอดที่มี Mastermix (Primer/ Template Mix)

4. หลังจากนั้นดูด 4 µl ของ (Enzyme/ Primer/ Template Mix) ไปใส่ในหลอด Microcentrifuge 0.5 ml ที่มี d/ ddNTP Mix

5. Centrifuge อย่างรวดเร็ว

6. ใส่เข้าเครื่อง Thermal Cycler

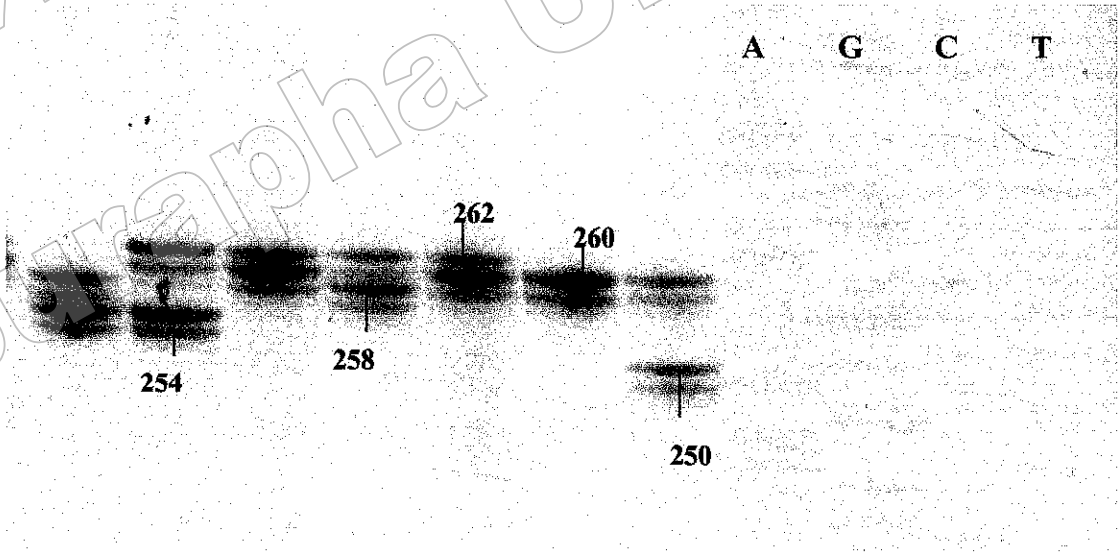
ตั้งค่าเครื่อง Thermal Cycler ดัง Profile ดังกล่าว

95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (Denaturation)

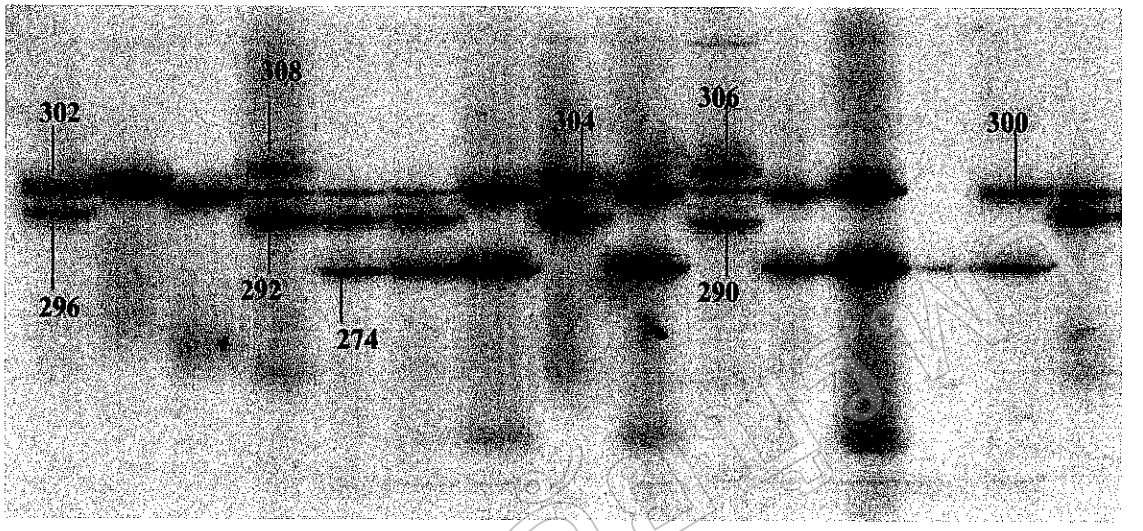
70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (Annealing and Extension)

ทำทั้งหมด 40 รอบ และ Hold ที่ 4 องศาเซลเซียส

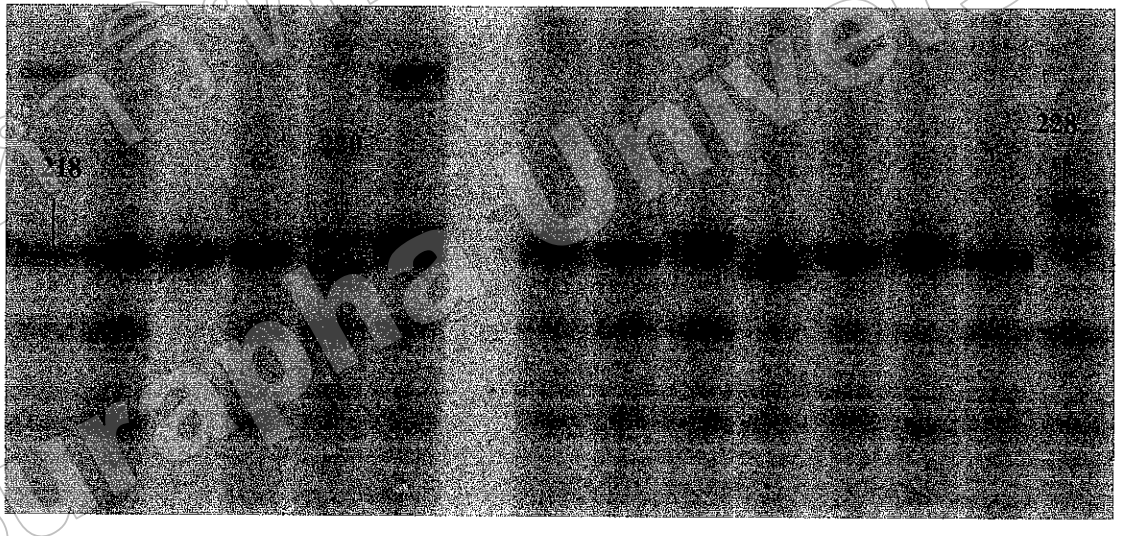


ภาพที่ 6 จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ CA2 เทียบกับลำดับเบส ของ pGEM-3Zf (+) Vector

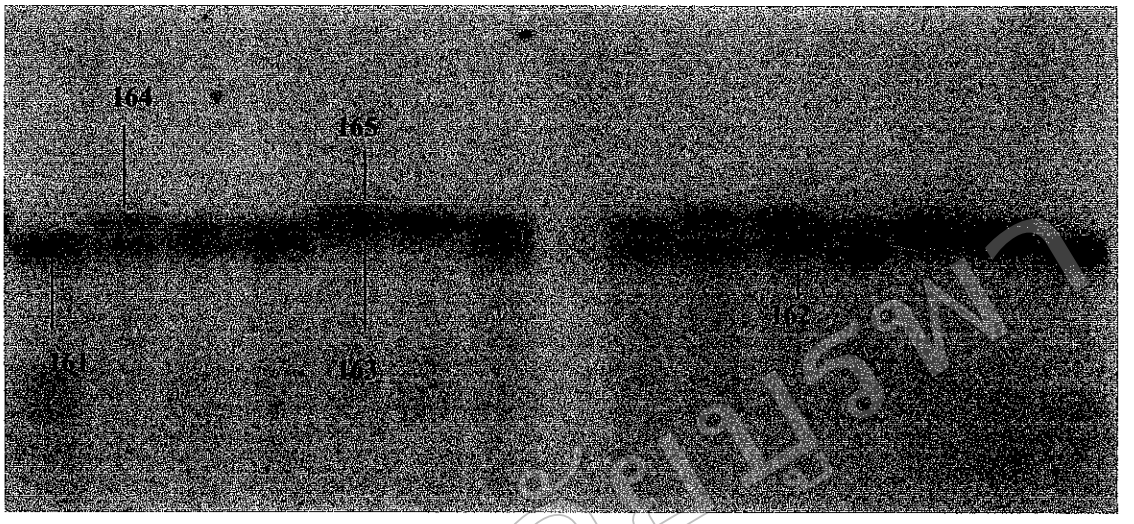
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 7 จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ CA6



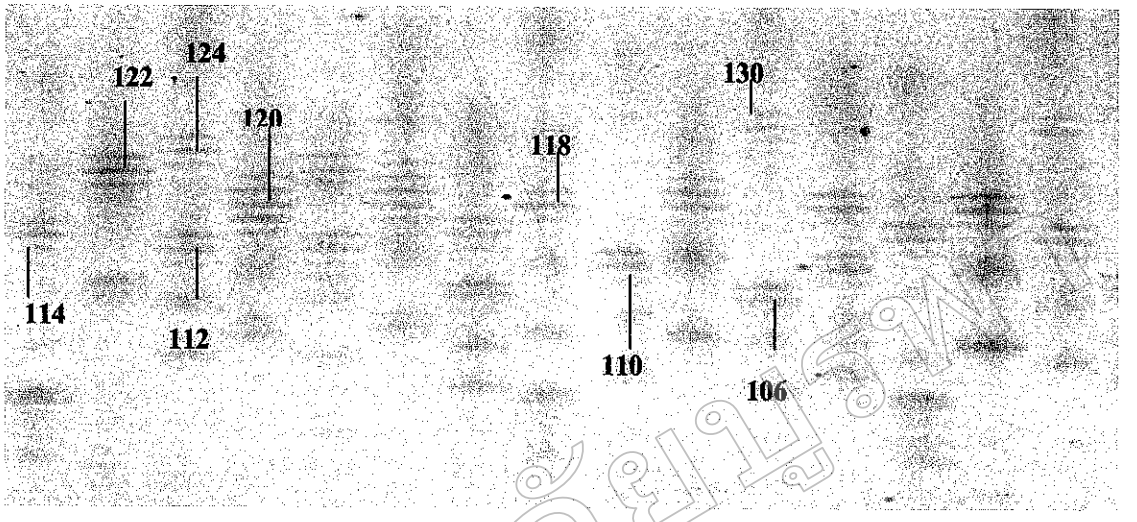
ภาพที่ 8 จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ CA7



ภาพที่ 9 จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ EM07

ภาพที่ 10 จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ EM08

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 11 จีโนไทป์ของตัวอย่างลูกปลาเก๋าที่ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ EM10

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University