

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก

การสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Salt Extraction

สารเคมี

1. Protinase K (20 mg/ ml)

1.1 M Tris HCl	10	μl
1.2 M CaCl ₂	20	μl
1.3 H ₂ O	470	μl
1.4 Glycerol	500	μl
1.5 Proteinase K	20	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. 7.5M Amminuim Acetate

4. Isopropanol 100%

5. Ethanol 70%

6. TE 0.1X

6.1 1M Tris Base pH 8.0

6.2 0.5M EDTA pH 8.0

วิธีการ (ดัดแปลงจาก Aljanabi & Martinez, 1994)

- เขียนชื่อ ตัวอย่าง วันที่ และชื่อผู้เตรียมตัวอย่างลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
- คำนวณปริมาตร Lysis Buffer และสารละลาย Protinase K ที่ต้องการ โดยในแต่ละหลอดใช้ Lysis Buffer 500 μl และ Protinase K (20 mg/ ml) 10 μl
- ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่ในหลอด Microcentrifuge ที่มี Lysis Buffer และ Protinase K เพื่อย่อยเนื้อเยื่อ
- Incubate ตัวอย่าง และ Lysis Buffer ใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือ 55 องศาเซลเซียส โดยทิ้งไว้ข้ามคืน (7-8 ชั่วโมง)
- หลังจากนั้น รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- เติม 7.5 M Ammonium Acetate 150 μl ในหลอดตัวอย่าง

7. ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (14000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้โปรตีนที่ย่อยแล้วตกตะกอน
8. ดูดส่วนใสที่แขวนลอยอยู่ส่วนบนไปใส่ในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml อันใหม่
9. เติม Isopropanol 100% แห้งเย็น ปริมาตร 450 μ l ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าไปมา 50 ครั้ง เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
10. ใส่ตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แช่ไว้ 1 ชั่วโมง
11. ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (14000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 30 นาที
12. เติม Isopropanol 100% ทั้ง ปริมาตร 400-600 μ l เติม Ethanol 70% ปริมาตร 1 ml
13. ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าไปมา ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (14000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที
14. ค่อย ๆ เติม Ethanol 70% ทั้ง ระวังอย่าให้ตะกอนขาวที่ก้นหลอดหลุดไปด้วย
15. ปลอ่ยให้ตกตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
16. เติม TE 0.1X 50 μ l เพื่อให้ละลายตะกอนขาว และ Incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 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 0.5M EDTA, pH 8.0
3. Ethidium Bromide

วิธีการ (ดัดแปลงจาก BIO-RAD Laboratories, 2000)

1. ผสม Agarose Gel 1% (w/v ใช้ Buffer TBE เป็นตัวทำละลาย) ในปิกเกอร์ขนาด 80 ml
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 μ l + Dye 1 μ l
7. Load สารละลาย DNA ใส่ในแต่ละ Well ปริมาณ 4 μ l ต้อง Load Molecular Weight Standard เสมอ Standard 50 bp ใส่ DNA 3 μ l + Dye 1 μ l
8. ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 70 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที
9. นำ Gel ที่ได้มาย้อม Ethidium Bromide เป็นเวลา 10 นาที
10. นำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง UV Transluminator
11. บันทึกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ และสัดส่วนความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับปริมาณที่แน่นอน

การตรวจสอบขนาด ปริมาณดีเอ็นเอด้วย Agarose Gel Electrophoresis และทำ ความสะอาดชั้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR

สารเคมี

1. Agarose Gel
2. TBE
 - 2.1 Tris Ultra Pure
 - 2.2 Boric Acid
 - 2.3 0.5M EDTA, pH 8.0
3. Ethidium Bromide (0.001 mg/ml)

วิธีการ (ดัดแปลงจาก BIO-RAD Laboratories, 2000)

1. ผสม Agarose Gel 1% (w/v ใช้ Buffer TBE เป็นตัวทำละลาย) ในบีกเกอร์ ขนาด 80 ml
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 โดยใส่ Loading Dye 10% (DNA 2 μ l + Dye 1 μ l)
7. เตรียม Molecular Weight Standard 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder โดยใส่ Loading Dye 10X (DNA 5 μ l + Dye 1 μ l)

8. Load สารละลาย DNA และ Molecular Weight Standard 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ใส่ในแต่ละตัวอย่าง ปริมาณ 3 μ l
9. ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 70 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที
10. นำ Gel ที่ได้มาย้อม Ethidium Bromide (0.001 mg/ ml) เป็นเวลา 10 นาที
11. นำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง UV Transluminator
12. บันทึกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ และสัดส่วนความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับปริมาณที่แน่นอน
13. ทำความสะอาดผลผลิต PCR ด้วยชุดทำความสะอาด (QIAQUICK PCR Purification Kit, QIAGEN) ความเข้มข้นของผลผลิต PCR ทำความสะอาดแล้วอยู่ในช่วง 30-200 ng/ μ l
14. วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (Automated Sequencer รุ่น ABI 3730 XL) ที่หน่วยวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริษัท MACROGEN Inc. ประเทศเกาหลีใต้