ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

ข้อมูลน้ำหนักและความยาวของปลากะพงขาว

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 ข้อมูลน้ำหนักและความยาวของปลากะพงขาวปลารุ่นพ่อแม่ (RA-H) และรุ่นลูก (RF-H) ของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยอง

ลำดับที่	สัญลักษณ์	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	ว/ด/ป ที่เก็บตัวอย่าง
1	RA-H 1	-	-	22/4/2551
2	RA-H 2	-	-	22/4/2551
3	RA-H 3	-	-	22/4/2551
4	RA-H 4	-	-	22/4/2551
5	RA-H 5	-	-	22/4/2551
6	RA-H 6	-	-	22/4/2551
7	RA-H 7	-	-	22/4/2551
8	RA-H 8	-	-	22/4/2551
9	RA-H 9	-	-	22/4/2551
10	RA-H 10	-	-	22/4/2551
11	RA-H 11	-	-	22/4/2551
12	RA-H 12	-	-	22/4/2551
13	RA-H 13	-	-	22/4/2551
14	RA-H 14	-	-	22/4/2551
15	RA-H 15	-	-	22/4/2551
16	RA-H 16	-	-	22/4/2551
17	RA-H 17	-	-	22/4/2551
18	RA-H 18	-	-	22/4/2551
19	RA-H 19	-	-	22/4/2551
20	RA-H 20	-	-	22/4/2551
21	RA-H 21	-	-	22/4/2551
22	RA-H 22	-	-	22/4/2551
23	RA-H 23	-	-	22/4/2551
24	RA-H 24	-	-	22/4/2551

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 ข้อมูลน้ำหนักและความยาวของปลากะพงขาวปลารุ่นพ่อแม่ (RA-H) และรุ่นลูก (RF-H) ของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยอง (ต่อ)

ลำดับที่	สัญลักษณ์	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	ว/ด/ป ที่เก็บตัวอย่าง
25	RA-H 25	-	-	22/4/2551
26	RA-H 26	-	-	22/4/2551
27	RA-H 27	-	-	22/4/2551
28	RA-H 28	-	-	22/4/2551
29	RA-H 29	-	-	22/4/2551
30	RA-H 30	-	-	22/4/2551
31	RA-H 31	-	-	22/4/2551
32	RF-H 32	-	73	4/9/2551
33	RF-H 33	-	66	4/9/2551
34	RF-H 34	-	67	4/9/2551
35	RF-H 35	-	81	4/9/2551
36	RF-H 36	-	69	4/9/2551
37	RF-H 37	-	75	4/9/2551
38	RF-H 38	-	68	4/9/2551
39	RF-H 39	-	76	4/9/2551
40	RF-H 40	-	55	4/9/2551
41	RF-H 41	-	78	4/9/2551
42	RF-H 42	-	-	4/9/2551
43	RF-H 43	-	71	4/9/2551
44	RF-H 44	5.1	68	4/9/2551
45	RF-H 45	5.9	71	4/9/2551
46	RF-H 46	6.6	73	4/9/2551
47	RF-H 47	5.6	71	4/9/2551
48	RF-H 48	4.6	69.5	4/9/2551

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 ข้อมูลน้ำหนักและความยาวของปลากะพงขาวปลารุ่นพ่อแม่ (RA-H) และรุ่นลูก (RF-H) ของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยอง (ต่อ)

ลำดับที่	สัญลักษณ์	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	ว/ด/ป ที่เก็บตัวอย่าง
49	RF-H 49	5.4	69	4/9/2551
50	RF-H 50	4.9	67	4/9/2551
51	RF-H 51	6.1	74	4/9/2551
52	RF-H 52	4.7	64	4/9/2551
53	RF-H 53	6.4	74	4/9/2551
54	RF-H 54	5.3	72	4/9/2551
55	RF-H 55	4.5	64	4/9/2551
56	RF-H 56	4.2	65	4/9/2551
57	RF-H 57	5.4	69	4/9/2551
58	RF-H 58	4.8	67	4/9/2551
59	RF-H 59	5	69.5	4/9/2551
60	RF-H 60	5.2	68	4/9/2551
61	RF-H 61	4.5	66	4/9/2551
62	RF-H 62	5.4	69.5	4/9/2551
63	RF-H 63	4.8	66	4/9/2551
64	RF-H 64	4.8	68.5	4/9/2551
65	RF-H 65	4.9	67	4/9/2551
66	RF-H 66	4.9	69	4/9/2551
67	RF-H 67	5.4	70	4/9/2551

หมายเหตุ ลำดับที่ 1-31 ข้อมูลน้ำหนักและความยาวของปลากะพงขาว ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยองเป็นผู้บันทึกไว้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

ความถี่อัลลิลที่ไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ความถี่อัลลิลที่ไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง ในกลุ่มตัวอย่างประชากรปลากะพง ขาวจากโรงเพาะฟักและประชากรจากธรรมชาติบริเวณอ่าวไทย

Locus	ขนาดอัลลิล	TT-H	RA-H	RF-H	NK-H	CH-W	TR-W	PN-W
Lca74	***N***	56	30	36	39	65	53	66
	160	0.080	0.100	0.236	0.128	0.069	0.113	0.068
	162	0.125	0.017	0.000	0.141	0.092	0.066	0.045
	164	0.357	0.350	0.278	0.308	0.323	0.321	0.212
	170	0.357	0.150	0.389	0.385	0.400	0.481	0.553
	172	0.080	0.383	0.097	0.038	0.115	0.009	0.121
	174	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000
Lca60	***N***	56	31	36	39	65	53	66
	191	0.348	0.339	0.264	0.397	0.308	0.425	0.568
	199	0.045	0.032	0.014	0.000	0.015	0.028	0.030
	203	0.036	0.000	0.000	0.013	0.015	0.009	0.015
	207	0.027	0.016	0.028	0.038	0.000	0.000	0.015
	211	0.036	0.032	0.000	0.000	0.008	0.000	0.015
	214	0.205	0.323	0.597	0.295	0.346	0.311	0.242
	234	0.259	0.226	0.097	0.244	0.269	0.208	0.098
	238	0.045	0.032	0.000	0.013	0.038	0.019	0.015
LcaM21F	***N***	56	31	36	39	65	53	66
	163	0.134	0.081	0.250	0.103	0.069	0.170	0.258
	185	0.054	0.048	0.111	0.064	0.038	0.038	0.053
	189	0.152	0.145	0.056	0.218	0.185	0.160	0.152
	191	0.214	0.161	0.097	0.218	0.246	0.255	0.235
	193	0.286	0.161	0.236	0.205	0.269	0.236	0.167
	195	0.143	0.242	0.083	0.179	0.177	0.132	0.114
	197	0.018	0.161	0.167	0.013	0.015	0.009	0.023

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Locus	ขนาดอัลลิล	TT-H	RA-H	RF-H	NK-H	CH-W	TR-W	PN-W
Lca64	***N***	56	31	36	39	65	53	65
	280	0.045	0.032	0.000	0.013	0.023	0.019	0.015
	283	0.170	0.242	0.250	0.179	0.192	0.217	0.254
	290	0.000	0.000	0.000	0.038	0.008	0.009	0.008
	293	0.339	0.339	0.181	0.346	0.408	0.462	0.538
	298	0.429	0.323	0.542	0.244	0.254	0.151	0.100
	302	0.018	0.065	0.028	0.179	0.115	0.142	0.085
LcaM08F	***N***	56	31	36	39	65	53	66
	257	0.161	0.145	0.083	0.179	0.177	0.132	0.212
	261	0.679	0.661	0.833	0.756	0.646	0.764	0.621
	263	0.161	0.194	0.083	0.064	0.177	0.104	0.167
LcaM32	***N***	56	31	36	39	65	47	64
	140	0.009	0.032	0.000	0.000	0.031	0.011	0.023
	145	0.071	0.097	0.069	0.051	0.123	0.053	0.031
	149	0.188	0.242	0.139	0.192	0.177	0.138	0.188
	152	0.125	0.113	0.125	0.128	0.108	0.128	0.133
	157	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.023
	161	0.054	0.065	0.014	0.115	0.023	0.117	0.047
	165	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
	169	0.009	0.000	0.000	0.038	0.015	0.021	0.000
	173	0.170	0.194	0.153	0.090	0.162	0.074	0.211
	177	0.134	0.048	0.028	0.167	0.077	0.096	0.086
	180	0.080	0.048	0.014	0.051	0.100	0.064	0.023
	185	0.152	0.097	0.208	0.090	0.162	0.234	0.148
	189	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
	193	0.000	0.048	0.250	0.077	0.015	0.053	0.039
	197	0.009	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023
	215	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Locus	ขนาดอัลลิล	TT-H	RA-H	RF-H	NK-H	CH-W	TR-W	PN-W
Lc-m05	***N***	56	31	36	39	65	53	66
	196	0.009	0.032	0.014	0.026	0.008	0.019	0.015
	198	0.000	0.081	0.042	0.051	0.069	0.028	0.038
	202	0.054	0.145	0.056	0.154	0.054	0.085	0.174
	206	0.054	0.000	0.000	0.013	0.000	0.009	0.053
	208	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015
	210	0.071	0.081	0.014	0.077	0.062	0.075	0.053
	212	0.134	0.113	0.083	0.115	0.169	0.198	0.136
	214	0.107	0.065	0.139	0.167	0.108	0.075	0.061
	216	0.045	0.161	0.014	0.064	0.092	0.085	0.068
	219	0.116	0.097	0.472	0.167	0.185	0.217	0.091
	221	0.071	0.113	0.167	0.026	0.054	0.019	0.098
	223	0.089	0.016	0.000	0.038	0.054	0.019	0.045
	227	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.019	0.000
	229	0.080	0.016	0.000	0.051	0.031	0.123	0.045
	231	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
	233	0.036	0.032	0.000	0.038	0.000	0.000	0.068
	236	0.134	0.048	0.000	0.013	0.077	0.028	0.030

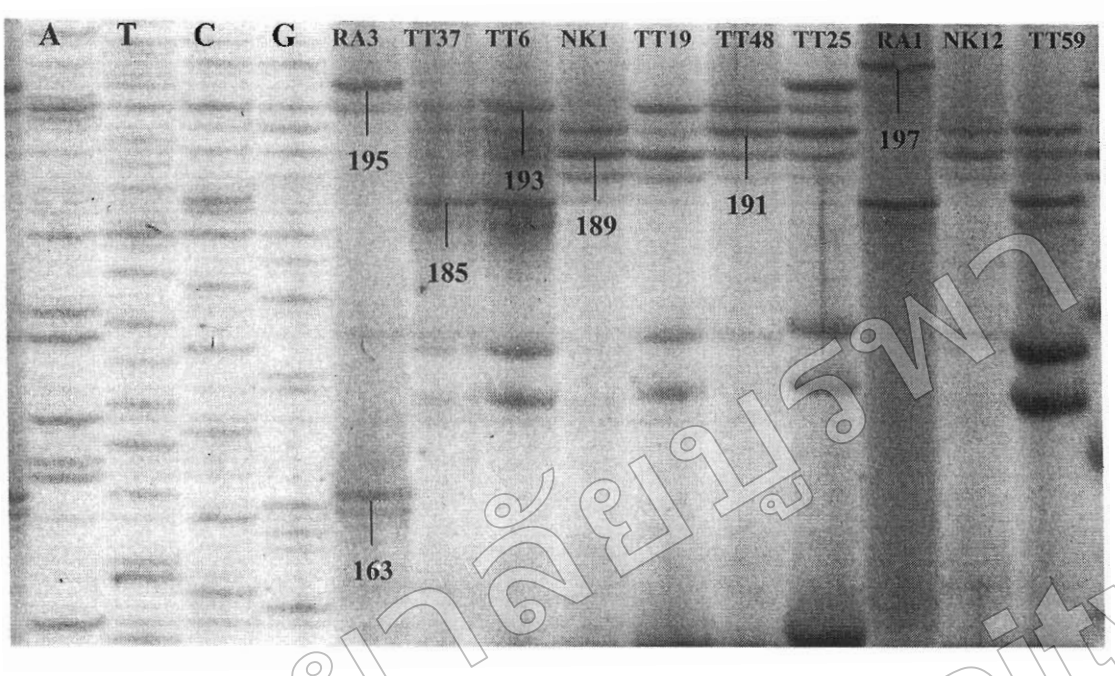
หมายเหตุ ตัวเลขที่ขีดเส้นใต้คือความถี่ของอัลลิลที่มีความจำเพาะในแต่ละประชากร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

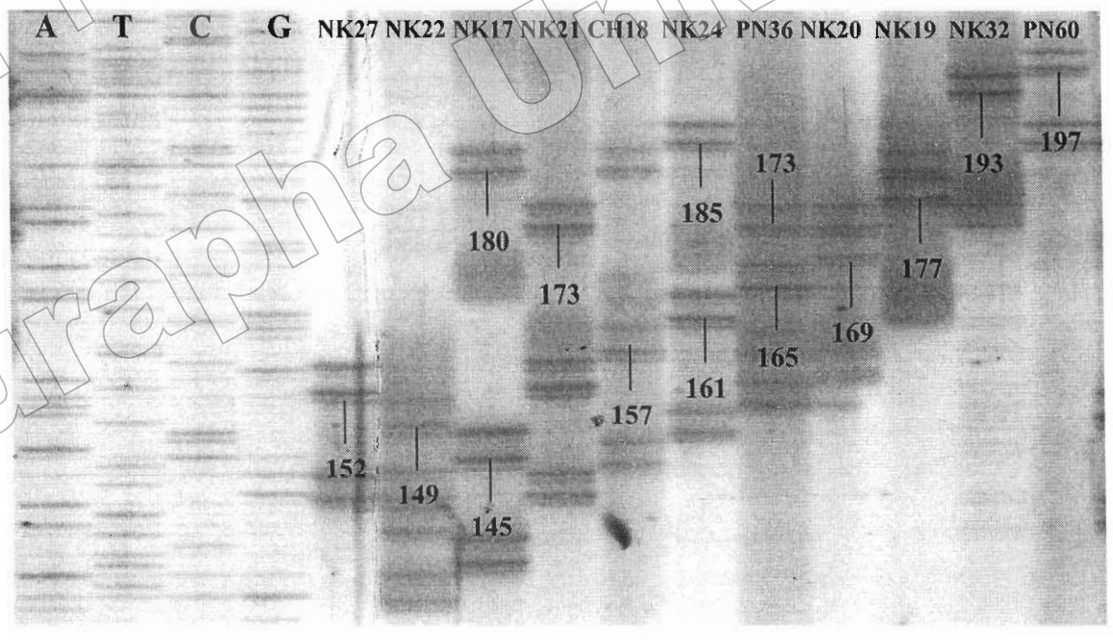
ภาคผนวก ค

ภาพจีโนไทป์ของปลากะพงขาว

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

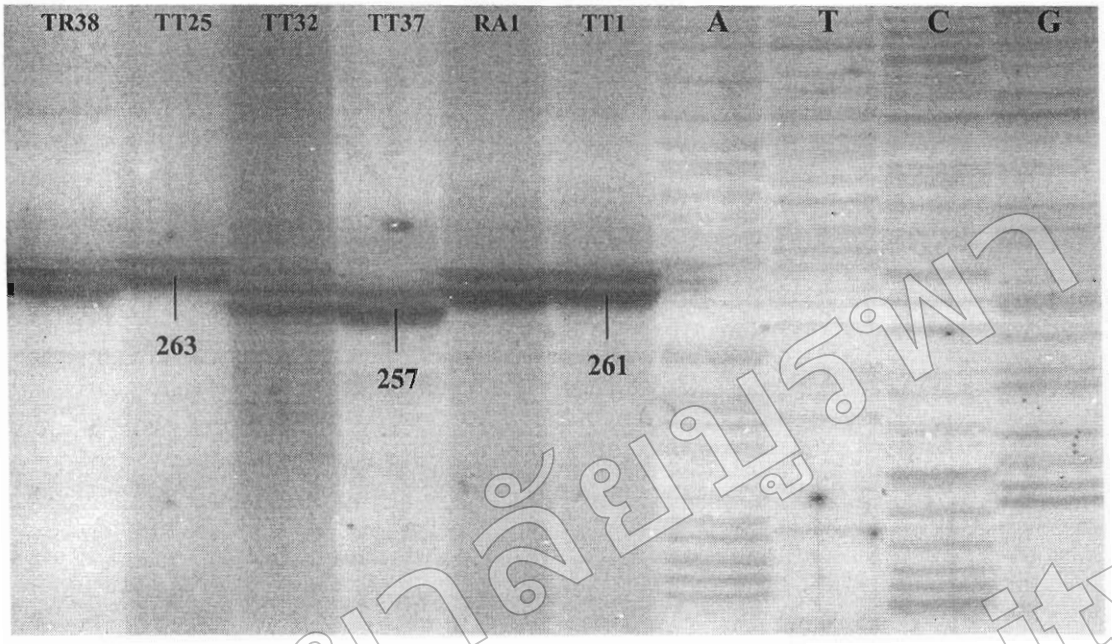


ภาพภาคผนวกที่ ค-1 จีโนไทป์ของปลากะพงขาวที่ตำแหน่งไมโครแซลเทลไลท์ *LcaM21F* เทียบกับลำดับเบส pGEM-3Zf(+) Vector

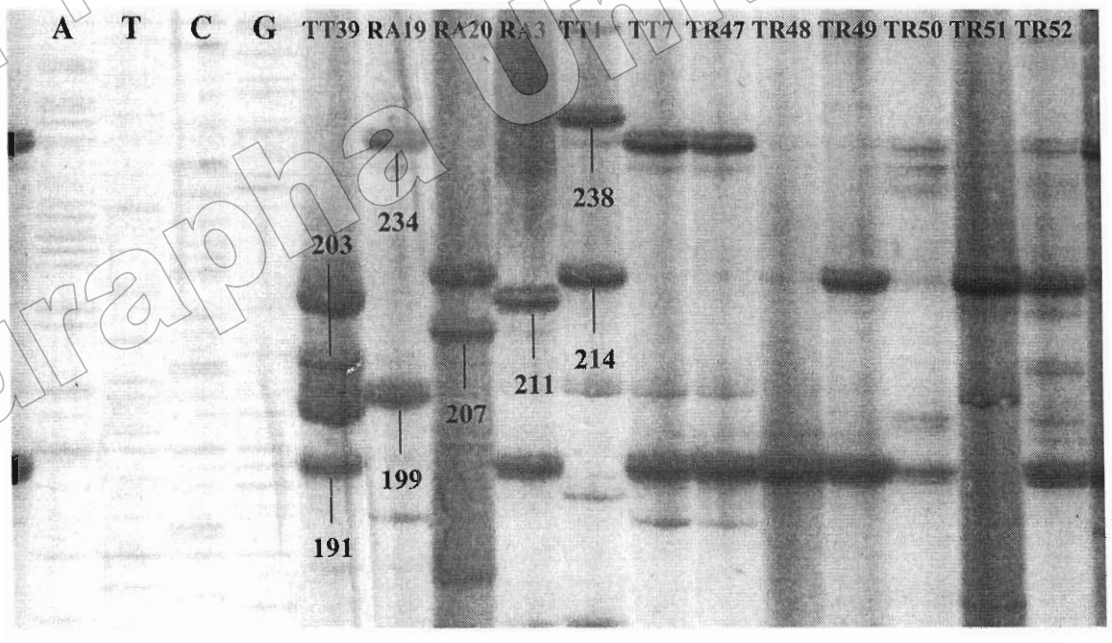


ภาพภาคผนวกที่ ค-2 จีโนไทป์ของปลากะพงขาวที่ตำแหน่งไมโครแซลเทลไลท์ *LcaM32* เทียบกับลำดับเบส pGEM-3Zf(+) Vector

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

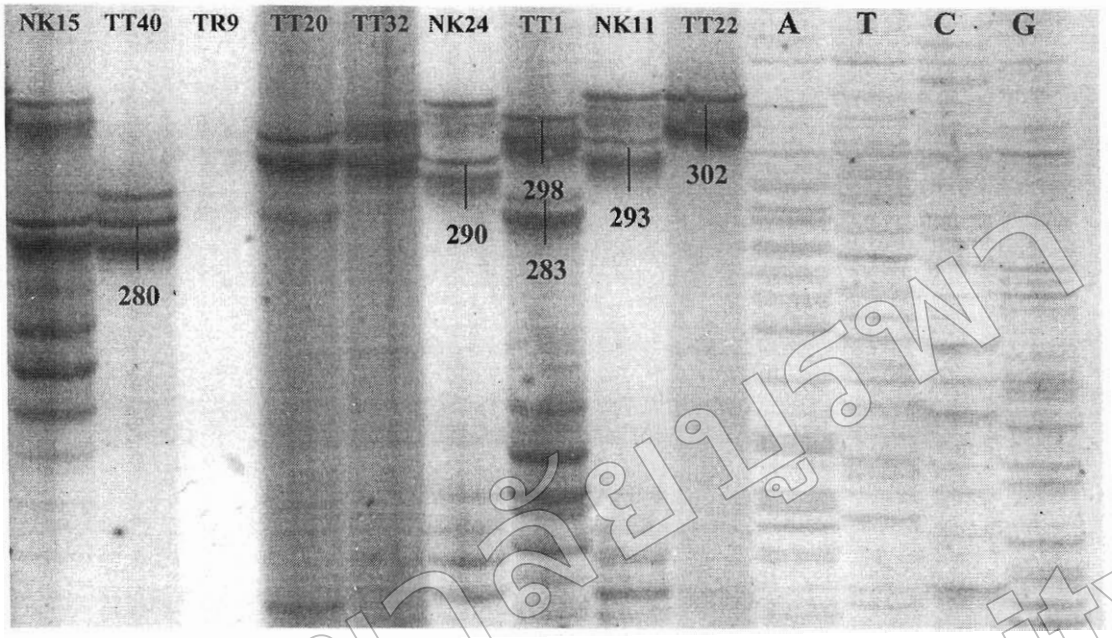


ภาพภาคผนวกที่ ค-3 จีโนไทป์ของปลากะพงขาวที่ตำแหน่งไมโครแซลเทลไลท์ *LcaM08F* เทียบกับลำดับเบส pGEM-3Zf(+) Vector

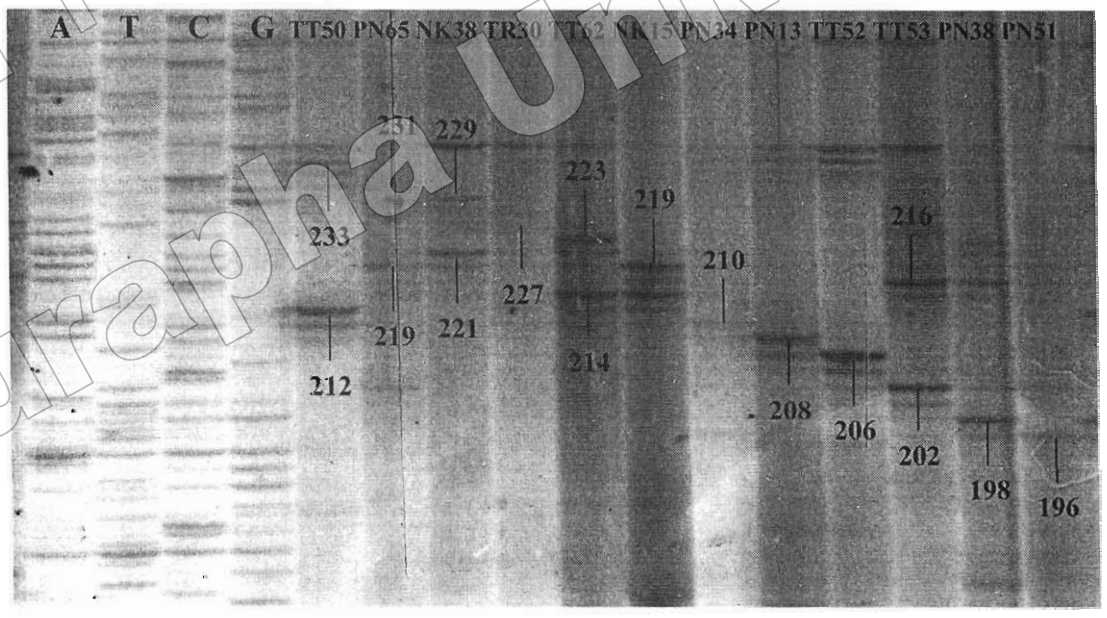


ภาพภาคผนวกที่ ค-4 จีโนไทป์ของปลากะพงขาวที่ตำแหน่งไมโครแซลเทลไลท์ *Lca60* เทียบกับลำดับเบส pGEM-3Zf(+) Vector

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

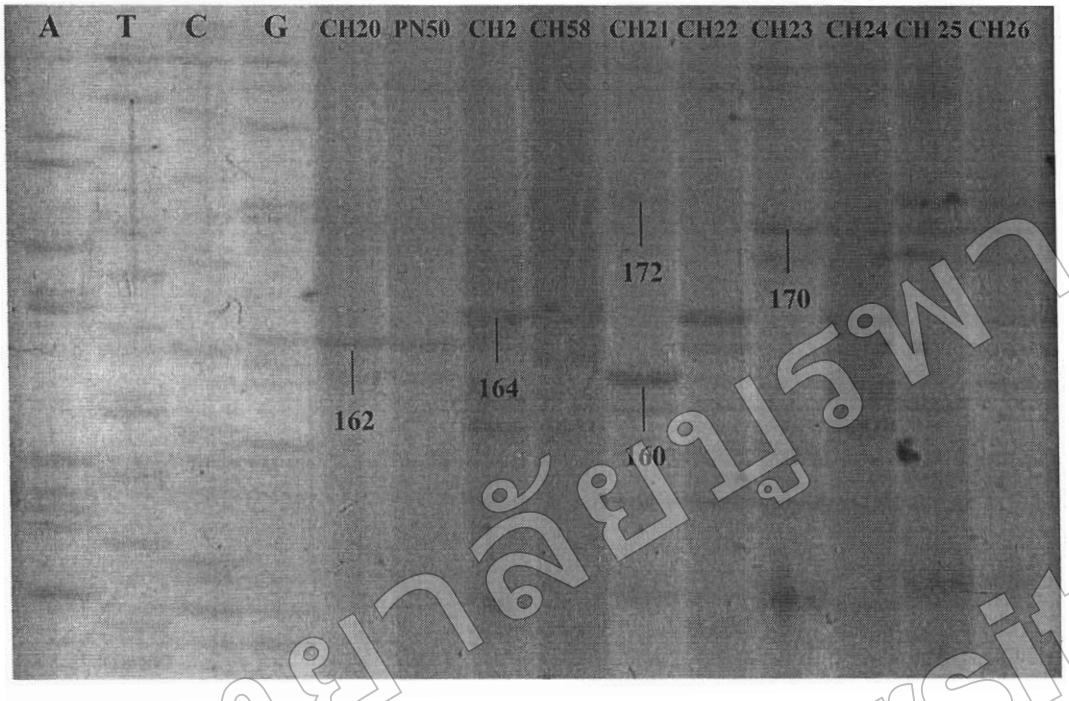


ภาพภาคผนวกที่ ค-5 จีโนไทป์ของปลากะพงขาวที่ตำแหน่งไมโครแซลเทลไลท์ *Lca64* เทียบกับลำดับเบส pGEM-3Zf(+) Vector



ภาพภาคผนวกที่ ค-6 จีโนไทป์ของปลากะพงขาวที่ตำแหน่งไมโครแซลเทลไลท์ *Lc-m05* เทียบกับลำดับเบส pGEM-3Zf(+) Vector

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพภาคผนวกที่ ค-7 จีโนไทป์ของปลากะพงขาวที่ตำแหน่งไมโครแซลเทลไลท์ *Lca74* เทียบกับลำดับเบส pGEM-3Zf(+) Vector

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ง

วิธีการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี Salt extraction

สารเคมี

1. Protenase K (20 mg/l)

1.1 10m M Tris HCl	10	µl
1.2 20 m M $CaCl_2$	10	µl
1.3 H_2O	235	µl
1.4 50 % Glycerol	250	µl
1.5 Proteinase K	0.01	mg

2. Lysis Buffer (1,000 µl)

2.1 1 M Tris HCl	100	µl
2.2 0.5 M EDTA	4	µl
2.3 10% SDS	200	µl
2.4 6 M NaCl	66	µl
2.5 H_20	630	µl

3. 6.0 M Sodium choride
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 วิธีของ Aljanabi and Martinez (1997)

1. เขียนชื่อ ตัวอย่าง วันที่ และชื่อผู้เตรียมตัวอย่างบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
2. คำนวณปริมาตร Lysis Buffer และสารละลาย Protenase K ที่ต้องการโดยในแต่ละหลอดใช้ Lysis Buffer 400 µl และ Proteinase K (20 mg/l) 10 µl
3. ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่ในหลอด Microcentrifuge ที่มี Lysis Buffer และ Proteinase K เพื่อย่อยเนื้อเยื่อ
4. Incubate ตัวอย่าง และ Lysis Buffer ใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงหรือ 55 องศาเซลเซียส (โดยทิ้งไว้ข้ามคืน 12-16 ชั่วโมง)
5. หลังจากนั้นรอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. เติม 6 M Sodium choride 300 µl
7. นำหลอดตัวอย่างมาเขย่าให้สารเข้ากัน 30 วินาที
8. ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (10,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้โปรตีนที่ย่อยแล้วตกตะกอน
9. ดูดส่วนใสที่แขวนลอยอยู่ส่วนบนไปใสในหลอด Microcentrifuge 1.5 ml หลอดใหม่ ปริมาตร 450 µl
10. เติม Isopropanol 100 % แช่เย็น ปริมาตร 450 µl
11. นำหลอดตัวอย่างมาเขย่าให้สารเข้ากัน 30 วินาที
12. ใส่ตัวอย่างในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แช่ไว้ 1 ชั่วโมง
13. ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (10,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 20 นาที
14. เท Isopropanol 100 % ทิ้ง ปริมาตรประมาณ 400-600 µl เติม Ethanol 70 % ปริมาตร 1 ml
15. นำหลอดตัวอย่างมาเขย่าให้สารเข้ากัน 30 วินาที
16. ปั่นหลอดตัวอย่างใน Centrifuge (10,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 20 นาที
17. ค่อย ๆ เท Ethanol 70 % ทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนขาวที่ก้นหลอดหลุดไปด้วย
18. ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
19. เติม TE 0.1X ปริมาตร 50 µl เพื่อละลายตะกอน
20. นำตัวอย่างแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน12-16 ชั่วโมง
21. 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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการ

1. ผสม Agrose Gel 1 % (ชั่ง Agrose 0.8 g ต่อ Buffer TBE 1X 80 ml) ในบีกเกอร์ขนาด 200 ml
2. อุ่นสารละลาย Gel บน Hot Plate เป็นเวลา 4 นาที
3. รอประมาณ 30 วินาทีเพื่อให้สารละลาย Gel ไม่ร้อนมาก
4. เทลงใน Cast Gel
5. รอให้ Gel แข็งตัว (ประมาณ 15 นาที)
6. เตรียมสารละลายดีเอ็นเอ (DNA 2 µl ต่อ Dye 1 µl) และ Molecular Weight Standard (100 bp; M23)
7. Load สารละลาย DNA ใส่ในแต่ละ Well ปริมาณ 3 µl และLoad Molecular Weight Standard (100 bp; M23) เสมอ 2 µl
8. ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 67 โวลท์ ประมาณ 45 นาที
9. นำ Gel ที่ได้มาย้อม Ethedium Bromide เป็นเวลา 10 นาที
10. ความเข้มของสารเรืองแสงของดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธีเดียมโบรไมด์ ภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง UV Transilluminator (Vilber Lourmat Etx-40M, French)
11. บันทึกขนาดดีเอ็นเอที่ได้ และสัดส่วนความเข้มของแถบดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder M23; ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม

การตรวจสอบ PCR Product ด้วย Gel Acrylamide แบบยาว

การเตรียมกระจกแผ่นใหญ่

สารเคมี

1.	Binding solution	
2.	Ethanol 95 %	49.75 ml
3.	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% โดยเช็ดแนวตั้ง และเช็ดตามแนวนอน
3. รอจนกระจกแห้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียมกระจกแผ่นเล็ก

สารเคมี

น้ำยากันฝ้า

วิธีการ

1. ทาน้ำยากันฝ้า โดยเช็ดเป็นวงกลมให้ขึ้นฝ้า 2 ครั้ง
2. เช็ดออกด้วยกระดาษทิชชูเปล่า

การเตรียม Gel

สารเคมี

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

วิธีการ

1. ประกบกระจกแผ่นใหญ่กับกระจกแผ่นเล็ก แล้วคั่นด้วย spacer เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับ Gel
2. เท Gel ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วลงในระหว่างกระจกแผ่นเล็ก และแผ่นใหญ่
3. ใส่ Comb ที่แผ่นกระจกรอให้ Gel แข็ง จากกระบวนการ Polymerzation ประมาณ 1 ชั่วโมง
4. เมื่อ Gel แข็งตัวแล้ว นำ Comb ออก และนำแผ่นกระจกไปประกอบกับชุด Gel Electrophoresis
5. เติมบัฟเฟอร์ 1X TBE ลงใน Gel Electrophoresis ทั้งด้านบนและด้านล่าง เพื่อเป็นตัวกลางในการนำไฟฟ้า
6. นำ Autopipatte มาดูดบริเวณขอบกระจกตลอดให้ทั่วทั้งแผ่น เพื่อให้เศษ Gel รวมทั้งสิ่งสกปรกหลุดออก
7. ดึงแผ่น Comb ออกอย่างระมัดระวัง
8. ใส่แผ่น Comb ด้านแหลม ให้ทิ่ม Gel ลงไปเล็กน้อย
9. Warm Gel โดยเปิดเครื่อง 30 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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

11. เตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการ ใช้ปริมาณ (DNA 1 µl ต่อ Dye 0.5 µl) ช่องละ 1.5 µl

12. Load DNA+Dye โดยเปลี่ยน Tip ในทุกตัวอย่าง

13. ผ่านกระแสไฟฟ้า 1200 โวลท์ เป็นเวลา 3.50 ชั่วโมง

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

1. หลังจากกระบวนการ Electrophoresis แยกแผ่นเจลทั้ง 2 แผ่นออกจากกันโดย Gel จะติดอยู่กับกระจกแผ่นใหญ่

2. วางกระจกแผ่นใหญ่ลงในถังเพื่อ Fix Gel ที่ติดกับกระจกด้วย Fix/stop Solution (Acetic Acid) เป็นเวลา 20 นาที เก็บ Fix/stop Solution (Acetic Acid) ที่ใช้แล้วเพื่อนำมาใช้หยุดปฏิกิริยา (ในขั้นที่ตอนที่ 7)

3. ล้างแผ่น Gel ด้วยน้ำ 3 ครั้ง ๆ 2 นาที ยกแผ่น Gel ขึ้นเพื่อให้น้ำไหลลงเป็นเวลา 10-20 วินาที

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

5. ล้างแผ่น Gel ด้วยน้ำ 5-10 วินาที

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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

8. ล้างแผ่น Gel ด้วยน้ำ 5-10 วินาที

9. ผึ่ง Gel ให้แห้ง 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

1. เขียนตัวอย่างที่หลอด Microcentrifuge 0.5 ml (A T C G)
2. เติม d/ ddNTP Mix ในแต่ละหลอด หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียม Mastermix (Primer/Template Mix) ดังนี้
   2.1 pGEM-3Zf(+) (4 µg)
   2.2 DNA Sequencing 5X Buffer
   2.3 pUC/M13 Forward Primer (5pmol)
   2.4 Nuclease-Free Water to Final volume
3. เติม 1 µl ของ Sequencing Grade Taq DNA Polymerase (5u/ µl) ลงในหลอดที่มี Mastermix (Primer/Template Mix)
4. หลังจากนั้นดูด 4 µl ของ (Enzyme/Primer/Template Mix)ใส่ไปในหลอด Microcentrifuge 0.5 ml ที่มี d/ ddNTP Mix
5. Centrifuge ให้ผสมเข้ากันอย่างรวดเร็ว
6. ใส่เข้าเครื่อง Thermal Cycler

ตั้งค่าเครื่อง Thermal Cycler ดัง profile ดังกล่าว

95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (Denaturation)

97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (Annealing and Extension) ทำทั้งหมด 40 รอบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University