

บทที่ 3

วัตถุประสงค์อุปกรณ์



### 3.1 ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย

ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อเสื่อม \* ชนิด ดูเซน / เบกเกอร์ คนละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 16 คน

### 3.2 อุปกรณ์ และสารเคมีในการเจาะเลือด

#### -อุปกรณ์ในการเจาะเลือด

- 3.2.1 เข็มเจาะเลือดเบอร์ 24
- 3.2.2 disposable syringe ขนาด 5-10 มิลลิลิตร
- 3.2.3 สายยางรัดแขน (Tumiquet)
- 3.2.4 หลอดทดลองใส่เลือด ขนาด 15 มิลลิลิตร
- 3.2.5 rack ใส่หลอดทดลอง
- 3.2.6 กระติกน้ำแข็ง
- 3.2.7 ถุงมือยาง
- 3.2.8 กระดาษพาราฟิล์ม (ใช้ปิดปากหลอดทดลอง)

\* ผู้ป่วยที่มีประวัติครอบครัว พบโรคกล้ามเนื้อเสื่อมมาก่อน และ/หรือ ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจเลือด หาเอ็นไซม์ในกล้ามเนื้อ และตัดชิ้นเนื้อตรวจว่ามีรูปแบบกล้ามเนื้อเสื่อม

-สารเคมีในการเจาะเลือด

3.2.9 0.2 M EDTA

3.2.10 70% เอทานอล

### 3.3 อุปกรณ์ และสารเคมีในการสกัด ดีเอ็นเอ

-อุปกรณ์ในการสกัด ดีเอ็นเอ

- 3.3.1 เครื่องปั่นแยกสาร ใช้หลอดทดลองขนาด 15 มล.
- 3.3.2 เครื่อง microcentrifuge (Hettich)
- 3.3.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (FOTODYNE)
- 3.3.4 เครื่อง UV spectrophotometer (SHIMADZU)
- 3.3.5 หลอด screw cap propylen ปลอดภัยขนาด 15 มล.
- 3.3.6 หลอด microfuge ปลอดภัยขนาด 15 มิลลิลิตร
- 3.3.7 disposable pipette ปลอดภัยขนาด 1 มิลลิลิตร
- 3.3.8 ปิเปตปลอดภัย ขนาด 5 - 10 มิลลิลิตร
- 3.3.9 auto pipette (Socorex) และ steriled tip pipette
- 3.3.10 ปิกเกอร์ปลอดภัย
- 3.3.11 rack ใส่หลอดทดลอง
- 3.3.12 ถุงมือยาง
- 3.3.13 กระดาษพาราฟิล์ม

### -สารเคมีในการสกัด ดีเอ็นเอ

- 3.3.14 lysis buffer (100 mM Tris - HCl, 0.32 M Sucrose, 0.01 % Triton X-100 pH 7.5)
- 3.3.15 proteinase K (GIBCO BRL)
- 3.3.16 STE buffer (sodium chloride, Tris,EDTA buffer)
- 3.3.17 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 3.3.18 phenol
- 3.3.19 chloroform
- 3.3.20 2 M sodium acetate
- 3.3.21 absolute ethanol
- 3.3.22 70% ethanol
- 3.3.23 1% sodium hypochloride (clorox)
- 3.3.24 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

### 3.4 อุปกรณ์ และสารเคมีในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ

#### - อุปกรณ์ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ

- 3.4.1 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler , PERKIN ELMER CETUS)
- 3.4.2 เครื่อง microcentrifuge (Hettich)
- 3.4.3 autopipette (Sororex) ขนาด 0.4 - 100 ไมโครลิตร
- 3.4.4 steriled tip pipette
- 3.4.5 microfuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร
- 3.4.6 rack ใส่หลอด microfuge

3.4.7 กระบะใส่น้ำแข็ง

3.4.8 ถุงมือยาง

- สารเคมีในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ

3.4.9 genomic DNA

3.4.10 dNTP (deoxy nucleotide triphosphate) (PERKIN ELMER)

-dATP (deoxy adenine triphosphate)

-dTTP (deoxy thymine triphosphate)

-dCTP (deoxy cytosine triphosphate)

-dGTP (deoxy guanine triphosphate)

3.4.11 primers : จำนวน 10 คู่ มีลำดับเบสดังในตารางที่ 2  
(Beggs et al.1990)

3.4.12 10X PCR buffer (PERKIN ELMER)

3.4.13 mineral oil (PERKIN ELMER)

3.4.14 1% sodium hypo chloride (clorox)

3.4.15 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3.5 อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

-อุปกรณ์ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.5.1 ชุดเครื่องมือ electrophoresis chamber (BIORAD)

3.5.2 เครื่องแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้า (volt meter) ( FOTODYE)

3.5.3 deairate pump

3.5.4 เครื่องเขย่าสาร (rotator)

ตารางที่ 2 ลำดับของไพรเมอร์ (primers) ทั้ง 10 คู่ ในการเพิ่มปริมาณยีนคิสโทรพีน และผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR

Primers	ลำดับเบส (5'→3')	Primers	ลำดับเบส (5'→3')	PCR Product(size)
PCR Reaction I				
PmF	GAA GAT CTA GAC AGT GGA TAC ATA ACA AAT GCA TG	PmR	TTC TCC GAA GGT AAT TGC CTC CCA GAT CTG AGT CC	535
3F	TCA TCC ATC ATC TTC GGC AGA TTA A	3R	CAG GCG GTA GAG TAT GCC AAA TGA AAA TCA	410
13F	AAT AGG AGT ACC TGA GAT GTA GCA GAA AT	13R	CTG ACC TTA AGT TGT TCT TCC AAA GCA G	238
43F	GAA CAT GTC AAA GTC ACT GGA CTT CAT GG	43R	ATA TAT GTG TTA CCT ACC CTT GTC GGT CC	357
47F	CGT TGT TGC ATT TGT CTG TTT CAG TTA C	47R	GTC TAA CCT TTA TCC ACT GGA GAT TTG	181
49F	GTG CCC TTA TGT ACC AGG CAG AAA TTG	49R	GCA ATG ACT CGT TAA TAG CCT TAA GAT C	439
50F(+)	CAC CAA ATG GAT TAA GAT GTT CAT GAA T	50R(+)	TCT CTC TCA CCC AGT CAT CAC TTC ATA G	271
52F	AAT GCA GGA TTT GGA ACA GAG GCG TCC	52R	TTC GAT CCG TAA TGA TTG TTC TAG CCT C	113
60F	AGG AGA AAT TGC GCC TCT GAA AGA GAA CG	60R	CTG CAG AAG CTT CCA TCT GGT GTT CAG G	139
PCR Reaction II				
6F	CCA CAT GTA GGT CAA AAA TGT AAT GAA	6R	GTC TCA GTA ATC TTC TTA CCT ATG ACT ATG G	202
50F	CAC CAA ATG GAT TAA GAT GTT CAT GAA T	50R	TCT CTC TCA CCC AGT CAT CAC TTC ATA G	271

Primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ตั้งชื่อหมายเลข exon ตาม Beggs *et.al.*( 1990)

Pm คือ promoter region

F คือ forward

R คือ reverse

(+) คือ การเพิ่ม และลดในปฏิกิริยาที่ 1

- 3.5.5 เครื่องดู ดีเอ็นเอ ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transluinater)  
(FOTODYE)
- 3.5.6 กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์
- 3.5.7 ฟิล์ม ขาว-ดำ โพลารอยด์
- 3.5.8 ปิเปต ปลอดเชื้อ
- 3.5.9 ขวดปลอดเชื้อรูปชมพู
- 3.5.10 ถุงมือยาง

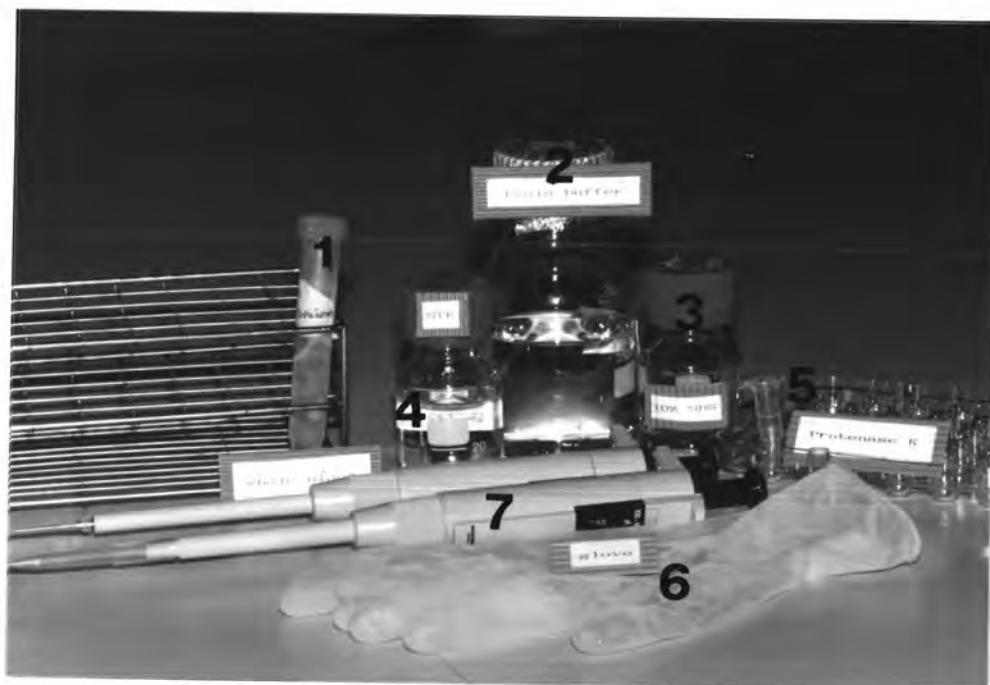
#### -สารเคมีในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

- 3.5.11 30% polyacrylamide (acrylamide, bis acrylamide)
- 3.5.12 3% ammonium persulfate (make fresh)
- 3.5.13 TEMED ( N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)
- 3.5.14 10X TBE (Tris borate EDTA buffer)
- 3.5.15 Ethidium bromide (2 $\mu$ g/ml)
- 3.5.16 tracking dye (0.025% bromo phenol blue, 0.025%  
cylene cyanol, 40% sucrose)
- 3.5.17 DNA size marker (  $\phi$  X -174 / Hae III DNA)
- 3.5.18 PCR product
- 3.5.19 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ



ภาพที่ 5 แสดงวัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเลือด

- |                      |                         |
|----------------------|-------------------------|
| 1) กระติกน้ำแข็ง     | 5) พาราฟิล์ม            |
| 2) 70 % เอทานอล      | 6) ถุงมือยาง            |
| 3) สำลี              | 7) เข็มและหลอดเจาะเลือด |
| 4) หลอดทดลอง มี EDTA |                         |



ภาพที่ 6 แสดงวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ

- |                 |                      |
|-----------------|----------------------|
| 1) เลือดผู้ป่วย | 7) ปิเปต             |
| 2) lysis buffer | 8) 2% sodium acetate |
| 3) 10 % SDS     | 9) phenol            |
| 4) STE buffer   | 10) chloroform       |
| 5) proteinase K | 11) 100% ethanol     |
| 6) ถุงมือ       |                      |





ภาพที่ 7 แสดงเครื่อง DNA thermal cycler และการจัดห้อง PCR ควรเป็นห้องที่สะอาดปลอดนิวคลีเอส และฝุ่นละออง ปิดประตู และอุปกรณ์ที่ใช้ต้องแยกใช้กับขั้นตอนอื่น



ภาพที่ 8 แสดงวัสดุอุปกรณ์ในการวิ่งอิเล็กโตรโฟรีซิส

- 1) PCR product
- 2) tracking dye
- 3) DNA size marker



ภาพที่ 9 แสดงห้องและอุปกรณ์ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

- |                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| 1) กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์  | 4) gel chamber      |
| 2) เครื่องกำเนิดแสง UV   | 5) ช้อนตักเจล       |
| 3) เครื่องแปลงกระแสไฟฟ้า | 6) ethidium bromide |