



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

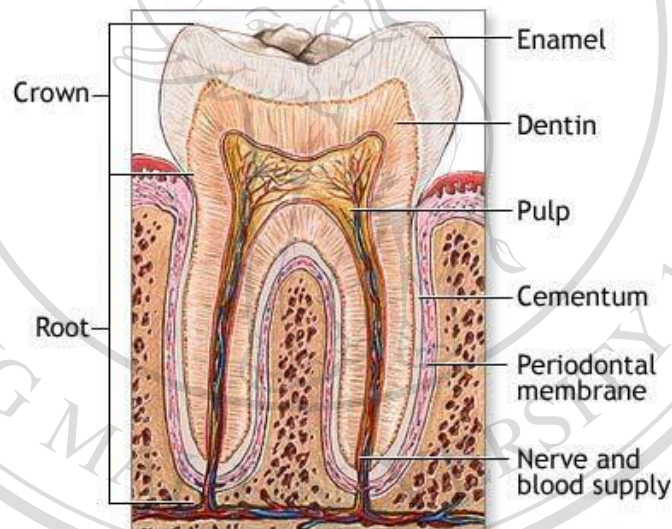
Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

## ภาคผนวก ก

### ฟัน (Teeth)

เป็นอวัยวะที่อยู่ภายในช่องปากของคนและสัตว์ มีส่วนรากติดอยู่กับขากรรไกรและมีตัวฟันโผล่พ้นเหงือกออกมา ฟันเป็นอวัยวะที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นนอก (Ectoderm) เช่นเดียวกับผิวหนังหรือเกร็ดปลา ทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหาร ช่วยในการออกเสียงพูดให้ถูกต้องชัดเจน และช่วยให้ใบหน้ามีความสวยงาม โดยธรรมชาติมนุษย์มีฟัน 2 ชุด ฟันชุดแรก คือ ฟันน้ำนม (Primary Teeth หรือ Deciduous Teeth) ขึ้นมาในวัยเด็ก มีลักษณะเป็นฟันซี่เล็กๆ สีค่อนข้างขาว มีทั้งหมด 20 ซี่ ฟันชุดที่สอง เรียกว่า ฟันถาวร หรือฟันแท้ (Secondary Teeth หรือ Permanent Teeth) มีขนาดใหญ่กว่าฟันน้ำนม สีค่อนข้างเหลือง มีทั้งหมด 32 ซี่



ภาพที่ 13 องค์ประกอบฟัน (<http://www.lcdental.com/tips/detail>)

เคลือบฟัน (enamel) : เป็นส่วนที่แข็งที่สุดของฟันมีส่วนประกอบของแคลเซียมและฟอสเฟต

เนื้อฟัน (dentine) : เป็นส่วนที่แข็งน้อยกว่าเคลือบฟัน มีความแข็งพอๆกับกระดูก ชั้นนี้มีการสร้างและสลายอยู่ตลอดเวลา เป็นชั้นที่มีเซลล์เป็นจำนวนมาก

โพรงประสาทฟัน (pulp) : เป็นที่อยู่ของเส้นเลือดที่นำอาหารมาหล่อเลี้ยงฟัน และนำของเสียออกจากฟัน และมีเส้นประสาทรับความรู้สึกของฟัน

เคลือบรากฟัน (cementum) : เป็นส่วนของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่อยู่ภายในรากฟัน เป็นส่วนที่ห่อหุ้มปกคลุมรากฟันทั้งหมด มีสีเหลืองอ่อนและทึบแสง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP การแยกแอมพลีคอนโดยผ่านกระแสไฟฟ้า และการย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining

การเตรียมสารเคมีในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค LAMP

### 1. การเตรียม 2.5 mM each dNTPs Solution

- dATP	Stock 100 mM	2.5	µl
- dTTP	Stock 100 mM	2.5	µl
- dCTP	Stock 100 mM	2.5	µl
- dGTP	Stock 100 mM	2.5	µl
- น้ำ(H <sub>2</sub> O)		90	µl
Total		100	µl

ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 100 µl

### 2. การเตรียม Primer mix solution

- 100 µM FIP primer	16	µl
- 100 µM BIP primer	16	µl
- 100 µM F3 primer	2	µl
- 100 µM B3 primer	2	µl
- น้ำ(H <sub>2</sub> O)	64	µl

ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายที่มีปริมาตร 100 µl

### การเตรียมสารละลายในกระบวนการแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้า(Electrophoresis)

#### 1. การเตรียม 34% Acrylamide solution

- Acrylamide	16.18	g
- N,N'methylenebisacrylamide	0.82	g

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ml

#### 2. การเตรียม 10X Gel buffer (330 mM Tris)

- Tris	8.0	g
--------	-----	---

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ml

ปรับ pH ด้วยกรดซัลฟิวริก ให้เท่ากับ 4.5

#### 3. การเตรียม 8.5% Acrylamide gel (ปริมาตร 37.015 มิลลิลิตร/ 1 แผ่น)

- น้ำกลั่น	21.26	ml
- 10X Gel buffer	3.7	ml
- 34% Acrylamide solution	9.3	ml
- 87% Glycerol	2.55	ml
- 10% Ammoniumoersulfate	191.0	μl
- Tetramethylethylenediamine	14.0	μl

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ Sterrier plate นาน 1 นาที โดยสังเกตไม่ให้เกิดฟองอากาศ

จากนั้นเทลงในชุดกระจกสำหรับเตรียมเจลปึกหัวสำหรับทำให้เกิดช่อง แล้วทิ้งเจลไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง

#### 4. การเตรียม 2.5X Running TBE buffer (Stock solution)

- Tris	54.0	g
- EDTA	3.72	g
- Boric acid	27.5	g

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2000 ml

## 5. วิธีเตรียม Working Solution (1000 ml)

- 2.5X Running buffer (Stock solution) 400 ml
- น้ำกลั่น 600 ml

## 6. การเตรียม Loading dye

- Bromophenol blue 0.04 g
- 87% Glycerol 500  $\mu$ l
- น้ำกลั่น 500  $\mu$ l

ผสมสารทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

## 7. วิธีแยกแถบดีเอ็นเอ

- ใช้ปริมาณ LAMP product 5  $\mu$ l ผสม loading dye 1  $\mu$ l โหลกลงบนแผ่นเจล
- ใช้กระแสไฟฟ้า 85 volt นาน 16 ชั่วโมง 30 นาที
- ทำการย้อมเจลด้วยวิธี Silver Staining

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของ Set Primer สำหรับเทคนิค LAMP

(Nogami *et al.*, 2008)

Y-chromosome Specific Primer

FIP: 5'-aatccgaatggtcagggcagg-ccagttaagctctgatggtt-3' (41 mer)

F1c (nt433-452)-F2 (nt382-402)

BIP: 5'-gactcttctcctctaaatattggctg-tttggcccttcatggaac-3' (44 mer)

B1c (nt453-477)-B2 (nt513-531)

B3: 5'-ctggtcagtcagagttgac-3' (nt533-551)

F3: 5'-ggccaattttacagttcc-3' (nt349-368)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved



ลำดับเบสของดีเอ็นเอ Template Human Amelogenin Y

>Human AmelY (NCBI, 2009)

>gi|224589823:c6742068-6733959 Homo sapiens chromosome Y, GRCh37.p2 primary reference assembly

1 acatagcaca cttgttttaa cgaaaaaacag acctcaaata tattctgtac tatatagatt  
61 ttttaaaagt aatitttagtc tctcttaatg ttaacaattg catattgact taatctctta  
121 cttctcttct cttctcttca cactctccct tctctctct tctcttctc ctcccctct  
181 ccctataaaa gctaccacct cactctgggc accctgggta tatcaacttc agctatgagg  
241 taattttct ctttactaat ttgatcact gtttgacata gcagtcacct gggctctgta  
301 aagaatagtg ggtggattct tcatcccaaa taaagtgggt tctcaagtgg tcccaattt  
361 acagttccta ccatcagctt cccagtttaa gctctgatgg ttggcctcaa gctctggtg  
421 ctccagcacc ctctgcctg accattcggg ttgactcttt cctctaaat atggctgtaa  
481 gtttattcat tcatgaacca ctgctcagga aggttccatg aaagggcaaa aagtcaactc  
541 tgactgacca gcttggttct atccatccg gtaaatgta aagattaggt aaaaactacta  
601 actttgggca aataattcc tctcttggg accctgggtt tctcattgg acaagggaaa  
661 ttactgtaat attcacatt caaaatattg gagaataata tagttaacaa ttataaaaaac  
721 tgccttgca agtataat gaggcaagga actgatttt tattgattc atcgtgtatt  
781 accatataaa gaatcccaaa acctaagggt aactaaggtg gtatactgtt cagaaaaggaa  
841 taaaattctt acttctctca taggttcagg taacaactg tgagttatt tacttacaca  
901 agctgctgac aaatgtaat aagaatctga ggcaggttt tctgttaaac ctaaaagatt  
961 gacaaaattg atcagtaaaa tctgtgttt taggttgagg gacagtggtt gaccggcttt  
1021 ttcccctt gtagatcaa aggaaagatg aaftaacat tatgacat tattgaggca  
1081 taattttatg ttgctttgc tctacaatg aaaagcagga cctatggaaa taacagatt  
1141 tactccctt gtaactcag tcaagttaat gaatctctt aactcccat gacttatct  
1201 aaaaagttag agtaacaata ctgcctctc agcatataag gaaagatgaa gaatgtgtg  
1261 gatggatgta aacacagtgc ctgacacaca ggaagtacc aacaaatgt ttacctctt  
1321 ctttctctg tagaaactac attctcaggc tatcaatgtt gacaggatg ctttagtgag  
1381 tctatattc ctaccgcatc agtgaattc tgcattggat gaaagtaaat taatcaaat  
1441 ggattcfaat atactttct cttaagggtg taccctctt gaagtggatc cagagcatga  
1501 taagaccacc agtatgtaga cattttgtc ttattccct gaaaatatta ggcattgatt  
1561 taaaatccca tttaagaaa ataccatgtg tactcccatc acagacacta atgggaaatt  
1621 tagttgtaa aaaatcatgt ctgtgtacac agttacaat tttgcaaaag gaaagataaa  
1681 taacaattc ctatggccat aatggcaaa gcaaacactg tgcctctctg gttggagtea  
1741 cgtgagccaa tggtaaacct gcatctctg ttctaccag tactctctc atggttacga  
1801 gcccatgggt ggatggctgc accaccaat catcccctg ggtcccaac agcacecct  
1861 gactcacacc ctgcagtctc ataccacat cccagtgggt ccagctcagc agcccagggt  
1921 ccgccagcaa gcaactgatc ctgttctctg ccagcaatcc atgactccaa cccaacaca  
1981 tcagccaaa ctcctctgc ctgccagca gccctccag ccccagctc ttacgccaca  
2041 gccatccag cccatgagc cccagccacc tgtgcaacc atgcagcccc tgcgccaca  
2101 gccacctct cctccaatg tcccctgctg gccctgccc eccatctc ctgatctgca  
2161 tctggaagct tggccagcaa cagacaagac caagcaggag gaagtgggga gtacacctg  
2221 aagccactac aatgcaaatc ctgtgaaaat ggtgcagcaa agttggcccc agagttctaa  
2281 ggggtccaac aactcagggt ctagagttg agtagttaca gatctatgat tctattagtc  
2341 caagtaatat gttgtatct tacattataa acaaatatt cttaatggct tggtaattaa  
2401 gaacacagtt ttatgatag gtttaaat tttattatt gaattctac cagactgat  
2461 attatgacaa cccattaata gaaaaatata ttattaaacc ctcttaatt taaggcaaac  
2521 agcaataagg gaatacatg tcttctatt caaagattt actcacaaga agaggctaga  
2581 attgcagtga aggttaaga taagatgggg tgggtaatt tttagtgca tatattgaa  
2641 caagctatga aagtgatag ggaatctct ttaaaaaac ctatacgaag gtttccatt  
2701 ttcagtagtt ttactctaa ctggaggag gctaaactaa acatgctgtt agagtcttt  
2761 ttagtctga gattctatg atgattaagc tttaaaaag aagtaccic aatttatgac  
2821 tgaatctccc attacaaga gcacttaca atgaatggga ataactaata aaaaaactt  
2881 atccacatcc ataaaaactt atttactgt atataagatt atgtgacta tcaattatat  
2941 gtafcaact gtaattccaa ttatacaag ctattgatga tatactactg agaagcagag  
3001 aaaagtggag tggaaatgac caggatagac agccaggaca gctagggtca agttctggct  
3061 ttcccctcaa aaaggaggca ctattgtaa agtacttca aatgtgtgag tattttctg  
3121 tcttttaaag gggggaaaat gacaaaatca gatctttc aagcctctga ccaggataa  
3181 atgtgataac ttctgaatta aaaaatcata atatatgta taaatggctt aataattgtg  
3241 agcatgtta cagagaatat gggcagaat tt

ลิขสิทธิ์ © 2564 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © 2021 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
All rights reserved



ภาคผนวก จ

ตำแหน่งจับของ Primer บนสายดีเอ็นเอ Template

Sequence of primer design

Human amelogenin (AMELY) gene, 3' end of cds

(สาย Complementary)

1 acatagcaca cttgttttaa cgaaaacag acctcaaata tattctgtac tatatagatt  
61 ttttaaaagt aattttagte tetcttaatg ttaacaattg catattgact taatctetta  
121 ctctctcttc ccttctctca cactctecet tctctctctt ttctctcttc ctcccctct  
181 ccctataaaa gctaccacct catctctgggc/acctctggta tatcaacttc agctatgagg  
241 taatttttct ctttactaat ttgatcact gtttgcatta gcagtcacct gggctctgta  
F3  
301 aagaatagtg ggtggattct tcaccctaaa taaagtgggt tcctcaagtgg tcccaatttt  
F2  
361 acagttccta ccatcagctt cccagtttaa gctctgatgg ttggcctcaa gcctgtgttg  
F1c B1c  
421 ctccagcacc ctctgctg accattcgga ttgactcttt cctcetaaat atggctgtaa  
aatccgaa tggtcaggca gg  
B2 B3  
481 gtttattcat tcatgaacca ctgctcagga aggttccatg aaagggcaaa aagtcaactc  
ttttgcc tttcatggaa c ctggtcag  
541 tgactgacca gcttgggtct atcccatccg gtaaaatgta aagattaggt aaaattacta  
tcagagttga c

ภาคผนวก จ

ตาราง Chi-Square

df	ระดับนัยสำคัญ														
	0.999	0.99	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.01	0.001
1	0.000002	0.000157	0.003932	0.015791	0.064	0.148	0.275	0.455	0.708	1.074	1.642	2.706	3.841	6.635	10.827
2	0.00200	0.02010	0.103	0.211	0.446	0.713	1.022	1.386	1.833	2.408	3.219	4.605	5.991	9.210	13.815
3	0.024	0.115	0.352	0.584	1.005	1.424	1.869	2.366	2.946	3.665	4.642	6.251	7.815	11.345	16.266
4	0.091	0.297	0.711	1.064	1.649	2.195	2.753	3.357	4.045	4.878	5.989	7.779	9.488	13.277	18.466
5	0.210	0.554	1.145	1.610	2.343	3.000	3.656	4.351	5.132	6.064	7.289	9.236	11.070	15.086	20.515
6	0.381	0.872	1.635	2.204	3.070	3.828	4.570	5.348	6.211	7.231	8.558	10.645	12.592	16.812	22.457
7	0.599	1.239	2.167	2.833	3.822	4.671	5.493	6.346	7.283	8.383	9.803	12.017	14.067	18.475	24.321
8	0.857	1.647	2.733	3.490	4.594	5.527	6.423	7.344	8.351	9.524	11.030	13.362	15.507	20.090	26.124
9	1.152	2.088	3.325	4.168	5.380	6.393	7.357	8.343	9.414	10.656	12.242	14.684	16.919	21.666	27.877
10	1.479	2.558	3.940	4.865	6.179	7.267	8.295	9.342	10.473	11.781	13.442	15.987	18.307	23.209	29.588
11	1.834	3.053	4.575	5.578	6.989	8.148	9.237	10.341	11.530	12.899	14.631	17.275	19.675	24.725	31.264
12	2.214	3.571	5.226	6.304	7.807	9.034	10.182	11.340	12.584	14.011	15.812	18.549	21.026	26.217	32.909
13	2.617	4.107	5.892	7.041	8.634	9.926	11.129	12.340	13.636	15.119	16.985	19.812	22.362	27.688	34.527
14	3.041	4.660	6.571	7.790	9.467	10.821	12.078	13.339	14.685	16.222	18.151	21.064	23.685	29.141	36.124
15	3.483	5.229	7.261	8.547	10.307	11.721	13.030	14.339	15.733	17.322	19.311	22.307	24.996	30.578	37.698
16	3.942	5.812	7.962	9.312	11.152	12.624	13.983	15.338	16.780	18.418	20.465	23.542	26.296	32.000	39.252
17	4.416	6.408	8.672	10.085	12.002	13.531	14.937	16.338	17.824	19.511	21.615	24.769	27.587	33.409	40.791
18	4.905	7.015	9.390	10.865	12.857	14.440	15.893	17.338	18.868	20.601	22.760	25.989	28.869	34.805	42.312
19	5.407	7.633	10.117	11.651	13.716	15.352	16.850	18.338	19.910	21.689	23.900	27.204	30.144	36.191	43.819
20	5.921	8.260	10.851	12.443	14.578	16.266	17.809	19.337	20.951	22.775	25.038	28.412	31.410	37.566	45.314

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright © by Chiang Mai University  
 All rights reserved

df	ระดับนัยสำคัญ														
	0.999	0.99	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.01	0.001
21	6.447	8.897	11.591	13.240	15.445	17.182	18.768	20.337	21.992	23.858	26.171	29.615	32.671	38.932	46.796
22	6.983	9.542	12.338	14.041	16.314	18.101	19.729	21.337	23.031	24.939	27.301	30.813	33.924	40.289	48.268
23	7.529	10.196	13.091	14.848	17.187	19.021	20.690	22.337	24.069	26.018	28.429	32.007	35.172	41.638	49.728
24	8.085	10.856	13.848	15.659	18.062	19.943	21.652	23.337	25.106	27.096	29.553	33.196	36.415	42.980	51.179
25	8.649	11.524	14.611	16.473	18.940	20.867	22.616	24.337	26.143	28.172	30.675	34.382	37.652	44.314	52.619
26	9.222	12.198	15.379	17.292	19.820	21.792	23.579	25.336	27.179	29.246	31.795	35.563	38.885	45.642	54.051
27	9.803	12.878	16.151	18.114	20.703	22.719	24.544	26.336	28.214	30.319	32.912	36.741	40.113	46.963	55.475
28	10.391	13.565	16.928	18.939	21.588	23.647	25.509	27.336	29.249	31.391	34.027	37.916	41.337	48.278	56.892
29	10.986	14.256	17.708	19.768	22.475	24.577	26.475	28.336	30.283	32.461	35.139	39.087	42.557	49.588	58.301
30	11.588	14.953	18.493	20.599	23.364	25.508	27.442	29.336	31.316	33.530	36.250	40.256	43.773	50.892	59.702
40	17.917	22.164	26.509	29.051	32.345	34.872	37.134	39.335	41.622	44.165	47.269	51.805	55.758	63.691	73.403
50	24.674	29.707	34.764	37.689	41.449	44.313	46.864	49.335	51.892	54.723	58.164	63.167	67.505	76.154	86.660
60	31.738	37.485	43.188	46.459	50.641	53.809	56.620	59.335	62.135	65.226	68.972	74.397	79.082	88.379	99.608
70	39.036	45.442	51.739	55.329	59.898	63.346	66.396	69.334	72.358	75.689	79.715	85.527	90.531	100.425	112.317
80	46.520	53.540	60.391	64.278	69.207	72.915	76.188	79.334	82.566	86.120	90.405	96.578	101.879	112.329	124.839
90	54.156	61.754	69.126	73.291	78.558	82.511	85.993	89.334	92.761	96.524	101.054	107.565	113.145	124.116	137.208
100	61.918	70.065	77.929	82.358	87.945	92.129	95.808	99.334	102.946	106.906	111.667	118.498	124.342	135.807	149.449
500	407.946	429.387	449.147	459.926	473.210	482.946	491.371	499.334	507.382	516.087	526.401	540.930	553.127	576.493	603.446

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล

นายภูริชญ์ คำมงคล

วัน เดือน ปี เกิด

25 สิงหาคม 2530

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษา

โรงเรียนดาราวิทยาลัยจังหวัดเชียงใหม่

ปีการศึกษา 2548

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved