

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการเตรียมสารเคมีในการสกัด การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการดูผล สำหรับเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification

1. สารเคมีสำหรับสกัดตัวอย่าง (ชานินทร์, 2538)

1. การเตรียมน้ำยา Chelex ความเข้มข้น 5 %

Chelex 100	0.5	g
H ₂ O	10	ml

เวลาใช้ ดูดในส่วนที่เป็นเม็ด Chelex ใส่ใน Tube สกัดให้ท่วมตะกอนดีเอ็นเอ

2. การเตรียมน้ำยา TE⁻⁴

Tris Base (10 mM)	1.21	g
Na ₂ EDTA (0.1 mM)	0.037	g

หมายเหตุ ละลาย Tris ในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.5 แล้วค่อยเติม EDTA แล้วปรับ pH อีกครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 L น้ำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave

3. การเตรียมน้ำแอลกอฮอล์ 70%

แอลกอฮอล์ 95%	70	ml
H ₂ O	25	ml

4. อัตราส่วน Phenol : Chloroform = 1:1

5. อัตราส่วนสารตกตะกอนดีเอ็นเอ

4M NH₄AC (Ammonium Acetate) 1 ส่วน

100% Isopropanol 2 ส่วน

ต่อ น้ำสกัดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการสกัด 1 ส่วน

2.สารเคมีสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP

1.การเตรียม Master Mix สำหรับ 10 Tube แสดงไว้ในตาราง 8

ตาราง 8 แสดงการคำนวณปริมาณ Master Mix สำหรับ 10 Tube

Chemical	Volume/ 1 tube	Volume/11 tube
H ₂ O	10 µl	110 µl
10X Buffer	2.5 µl	27.5 µl
Betaine	4 µl	44 µl
dNTPs	4 µl	44 µl
Primer Mix	2.5 µl	27.5 µl
Bst.	1 µl	11 µl
Template	1 µl	-
Total	25 µl	264 µl

หมายเหตุ ต้องเตรียมเพื่อไว้ 1 Tube ป้องกันการขาดหายของสารผสม

2.การเตรียม Primer Mix ปริมาตร 100 µl

FIP	Primer Stock 100 µM	16	µl
BIP	Primer Stock 100 µM	16	µl
F3	Primer Stock 100 µM	2	µl
B3	Primer Stock 100 µM	2	µl
H ₂ O		64	µl
Total		100	µl

3.การเตรียม dNTPs เข้มข้น Stock 2.5 mM each ปริมาตร 100 µl

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
H ₂ O		90	µl
Total		100	µl

3.สารเคมีสำหรับตรวจสอบผล LAMP Product

1.การเตรียม 0.5X TBE Buffer

Tris	5.4	g
Boric acid	2.75	g
EDTA	0.375	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ	1000	ml

2.การเตรียม 10X Loading Dye

Bromophenol Blue	0.04	g
87% glycerol	500	μl
น้ำกลั่น	500	μl

เขย่าให้เข้ากันจน Bromophenol Blue ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ Glycerol และน้ำกลั่น

3.การเตรียม 2% Gel Agarose

ผงเจล Agarose	1	g
ปรับปริมาตรด้วย 0.5X TBE Buffer	50	ml

นำไปต้มที่ 60 องศาเซลเซียส คนสารผสมด้วย Magnetic Stirrer จนสารละลายใส นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้หายฟองเดือดแล้วเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล จากนั้นปักหัวลงบนเจล

4.การเตรียมสารละลาย Ethidium Bromide

Ethidium bromide	10	μl
0.5X TBE	200	ml

เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในที่มืด ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังโดยตรง เนื่องจาก Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง

ภาคผนวก ข

Design Primer LAMP ด้วย Primer Explorer 3

(Eiken, 1999)

PrimerSet List

Primer set: sorting rule [Easy]

Target DNA CTCCCCTCCT

(Complement) gaggggagga

CONSENSUS (*) *****

Primer ID	dG(dimer)	
[52]	-2.16	
[42]	-1.98	
[34]	-2.01	
[73]	-2.13	
[13]	-2.36	[13]

[outputs: 5 sets] Displayed 1 -
5. DesignId 110327134814

```
CCCTATAAAA  GCTACCACCT  CATCCTGGGC  ACCCTGGTTA  TATCAACTTC
gggatatttt  cgatggtgga  gtaggaccg   tgggaccaat  atagttgaag
*****      *****      *****      *****      *****
181          191          201          211          221
```

A GCTACCACCT CATCCTGGGC ACCCTGGTTA TATCAAC

```

AGCTATGAGG TAATTTTCT CTTTACTAAT TTTGATCACT GTTTGCATTA
tcgatactcc attaaaaaga gaaatgatta aaactagtga caaacgtaat
*****
231          241          251          261          271

```

```

ta aaactagtga caaacgtaat

```

```

GCAGTCCCCT GGGCTCTGTA AAGAATAGTG GGTGGATTCT TCATCCCAAA
cgtcagggga cccgagacat ttcttatcac ccacctaaga agtagggttt
*****
281          291          301          311          321

```

```

[42]          TGTA AAGAATAGTG GGTGGATT
[34]          TGTA AAGAATAGTG GGTGGATT TCATCCCAAA

```

```

cgtGTCCCCT GGGCTCTGTA AAG

```

```

TAAAGTGGTT TCTCAAGTGG TCCCAATTTT ACAGTTCCTA CCATCAGCTT
atttcaccaa agagttcacc agggttaaaa tgtcaaggat ggtagtcgaa
*****
331          341          351          361          371

```

```

TAAAGTGGTT TCT AAGTGG TCCCAATTTT ACAGT
TAAAGTGGTT TCTCAAGTGG TC ggtagtcgaa
TAAAGTGGTT TC tgtcaaggat ggtagtcgaa
[73]          TGG TCCCAATTTT ACAGTTC CT
          ccaa agagttcacc aggg          gtcaaggat ggtagtcgaa

```

```

CCCAGTTTAA GCTCTGATGG TTGGCCTCAA GCCTGTGTTG CTCCAGCACC
gggtcaaatt cgagactacc aaccggagtt cggacacaac gaggtcgtgg
*****
381          391          401          411          421
      caaatt cgagactacc aaccggTCAA GCCTGTGTTG CTCCAG
gggtcaaatt cgTCTGATGG TTGGCCTCAA GC
gg  GTTTAA GCTCTGATGG TTGGCCT
CCCAGTTTAA GCTCTGAT
[13]

```

```

CTCCTGCCTG ACCATTCGGA TTGACTCTTT CTCCTAAAT ATGGCTGTAA
gaggacggac tggtaagcct aactgagaaa ggaggattta taccgacatt
*****
431          441          451          461          471
              actgagaaa ggaggattta tacc
              cct aactgagaaa ggaggattt
              cct aactgagaaa ggaggat
aggacggac tggtaagcct aTACTCTTT CTCCTAAAT ATGGCT

```

```

GTTTATTCAT TCATGAACCA CTGCTCAGGA AGGTTCCATG AAAGGGCAAA
caaataagta agtacttggt gacgagtcct tccaaggtac tttcccgttt
*****
481          491          501          511          521
      gta agtacttggt gacgag [52]
      gta agtacttggt gacgag [42]
      gta agtacttggt gacgag [34]
              ccaaggtac tttcccgttt

```

```

AAGTCAACTC  TGACTGACCA  GCTTGGTTCT
ttcagttgag  actgactggt  cgaaccaaga
*****      *****      *****
531          541          551

```

```

ctgactggt  cgaaccaag  [73]

```

1 ID:52 dimer(minimum)dG=-2.16

label 5'pos3'poslen Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	322	343	22	56.30	-5.35	-4.01	0.36	CATCCCAATAAAGTGGTTTCT
B3	488	506	19	55.48	-5.59	-4.07	0.47	GAGCAGTGGTTCATGAATG
FIP		43						GGCCCAACCATCAGAGCTTAAAC-AAGTGGTCCCAATTTTACAGT
BIP		43						TCAAGCCTGTGTTGCTCCAG-CCATATTAGGAGGAAAGAGTCA
F2	345	365	21	57.16	-5.00	-4.13	0.38	AAGTGGTCCCAATTTTACAGT
F1c	385	406	22	61.46	-6.36	-3.01	0.50	GGCCCAACCATCAGAGCTTAAAC
B2	452	474	23	56.99	-3.62	-4.76	0.39	CCATATTTAGGAGGAAAGAGTCA
B1c	407	426	20	62.25	-5.26	-5.19	0.55	TCAAGCCTGTGTTGCTCCAG

2 ID:42 dimer(minimum)dG=-1.98

label 5'pos3'poslen Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence

F3	297	318	22	56.66	-3.41	-4.41	0.36	TGTAAAGAATAGTGGGTGGATT
B3	488	506	19	55.48	-5.59	-4.07	0.47	GAGCAGTGGTTCATGAATG
FIP		44						GCTTAAACTGGGAAGCTGATGG-TAAAGTGGTTTCTCAAGTGGTC
BIP		42						TCTGATGGTTGGCCTCAAGC-TTTAGGAGGAAAGAGTCAATCC
F2	331	352	22	57.88	-3.24	-5.51	0.41	TAAAGTGGTTTCTCAAGTGGTC
F1c	371	392	22	61.22	-4.09	-4.91	0.50	GCTTAAACTGGGAAGCTGATGG
B2	448	469	22	56.94	-3.69	-4.51	0.41	TTTAGGAGGAAAGAGTCAATCC
B1c	393	412	20	62.12	-4.15	-5.26	0.55	TCTGATGGTTGGCCTCAAGC

3 ID:34 dimer(minimum)dG=-2.01

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	297	318	22	56.66	-3.41	-4.41	0.36	TGTAAGAATAGTGGTGGATT
B3	488	506	19	55.48	-5.59	-4.07	0.47	GAGCAGTGGTTCATGAATG
FIP			44					GGAAGCTGATGGTAGGAACTGT-TCATCCCAAATAAAGTGGTTTC
BIP			43					GTTTAAGCTCTGATGGTTGGCCT-TAGGAGGAAAGAGTCAATCC
F2	321	342	22	56.29	-4.76	-4.62	0.36	TCATCCCAAATAAAGTGGTTTC
F1c	361	382	22	61.60	-5.70	-4.55	0.50	GGAAGCTGATGGTAGGAACTGT
B2	448	467	20	55.21	-4.27	-4.51	0.45	TAGGAGGAAAGAGTCAATCC
B1c	385	407	23	62.94	-3.01	-6.59	0.48	GTTTAAGCTCTGATGGTTGGCCT

4 ID:73 dimer(minimum)dG=-2.13

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	348	367	20	55.02	-5.86	-4.51	0.40	TGGTCCCAATTTTACAGTTC
B3	542	559	18	56.74	-5.02	-4.76	0.56	GAACCAAGCTGGTCAGTC
FIP			41					ATCCGAATGGTCAGGCAGGA-CTTCCCAGTTTAAAGCTCTGAT
BIP			44					TGACTCTTTCCTCCTAAATATGGCT-TTTGCCCTTTCATGGAACC
F2	378	398	21	57.01	-5.30	-4.15	0.43	CTTCCCAGTTTAAAGCTCTGAT
F1c	432	451	20	62.97	-5.43	-6.10	0.55	ATCCGAATGGTCAGGCAGGA
B2	512	530	19	57.71	-5.52	-5.46	0.47	TTTGCCCTTTCATGGAACC
B1c	452	476	25	61.32	-4.76	-5.63	0.40	TGACTCTTTCCTCCTAAATATGGCT

5 ID:13 dimer(minimum)dG=-2.36

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	190	207	18	57.00	-4.81	-4.74	0.56	AGCTACCACCTCATCCTG
B3	362	380	19	55.82	-5.24	-4.51	0.47	AAGCTGATGGTAGGAACTG
FIP			45					TGCTAATGCAAAACAGTGATCAAAAT-GGCACCCTGGTTATATCAAC
BIP			38					GTCCCCTGGGCTCTGTAAAG-GGGACCACTTGAGAAACC
F2	208	227	20	57.51	-6.85	-4.06	0.50	GGCACCCTGGTTATATCAAC
F1c	259	283	25	60.24	-4.49	-3.32	0.32	TGCTAATGCAAAACAGTGATCAAAAT
B2	337	354	18	56.41	-6.30	-4.62	0.56	GGGACCACTTGAGAAACC
B1c	284	303	20	61.55	-6.30	-3.34	0.60	GTCCCCTGGGCTCTGTAAAG

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'-gactcttctcctaataatggctg-tttggcccttcatggaac-3' (44 mer)

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

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

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

ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของดีเอ็นเอ Template Human Amelogenin Y

>Human AmelY (NCBI, 2009)

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

1 acatagcaca ctgttttaa cgaaaaacag acctcaaata tattctgtac tatatagatt
61 ttttaaaagt aattttagtc tctttaaag ttaacaattg catattgact taactctta
121 ctctctctc cttctctca cactctccct tctctctct tctctctc ctcccctct
181 ccctataaaa gctaccacct catctgggg accctggta tatcaactc agctatgagg
241 taattttct ctttactaat ttgatcact gtttcatta gcagtccctt gggctctgta
301 aagaatagtg ggtggattct tcatcccaaa taaagtgggt tctcaagtgg tcccaatft
361 acagttccta ccatcagctt cccagtttaa gctctgatgg ttggcctcaa gctctgttg
421 ctccagcacc ctccctcctg accattcggga ttgactcttt cctctaaat atggctgtaa
481 gtttattcat tcatgaacca ctgctcagga aggttccatg aaagggcaaa aagtcaactc
541 tgactgacca gcttggttct atcccatccg gtaaaatgta aagattaggt aaaattacta
601 actttgggca aataattcc tctcttggga accctgggtt tctcatttgg acaagggaaa
661 ttactgtaat attcacattt caaaatattg gagaataata tagttaacaa ttataaaaa
721 tgccttctca agtataatg gagcaaggtg actgatttt tattgattac atcgtgtatt
781 accatataaa gaatcccaaa acctaagggt aactaagtgt gtatactgtt cagaaaaggaa
841 taaaattctt acttctctca taggttcagg taacaatctg tgagtattt tacttacaca
901 agctgctgac aatgtaaat aagaatctga ggcaagggtt tctgttaaac ctaaaagatt
961 gacaaaattg atcagtaaaa tctgtgttt taggttgagg gacagtgtt gaccggcttt
1021 ttcccctatt gtagatcaa aggaaaagatg aaattaacat tatgtcacat tattcgggca
1081 taattttatg ttgctttgc tcttacaatg aaaagcaggga cctatggaaa taacagatt
1141 tactcccttt gtaactcag tcaagttaat gaatctcttt aactcccat gaccttatct
1201 aaaaagttag agtaacaata ctgcctctc agcatataag gaaagatgaa gaatgtgtgt
1261 gatggatgta aacacagtgc ctgacacaca ggaagtaccc aacaaatgt ttaccttctt
1321 cttctcttg tagaactcac attctcaggc tatcaatgtt gacaggattg ctttagtgag
1381 tctatatttc ctaccgcatc agtgaatttc tgcatgggat gaaagtaaat taaatcaaat
1441 ggattctaat atatcttct ctttaagggtc taccctctt gaagtggtag cagagcatga
1501 taagaccacc agtatgtaga cattttgttc ttattccct gaaaatatta ggcatgcatt
1561 taaaatccca ttttaagaaa ataccatgtg tactcccat acagacacta atgggaaatt
1621 tagttgttaa aaaatcatgt ctgtgtacac agttacaat tttgcaaaag gaaagataaa
1681 tacaatattc ctatggccat aatggcaaa acaacactgc tgcttctctg gttggagtca
1741 cgtgagccaa tggtaaacct gcactctgt tctcaccag tactctctct atggttacga
1801 gcccattgggt ggatggctgc accaccaat catcccctg gttgccaac agcacccct
1861 gactcacacc ctgcagtctc ataccacat cccagtgggt ccagctcagc agcccagggt
1921 ccgccagcaa gcaactgatgc ctgttctctg ccagcaatcc atgactccaa cccaacacca
1981 tcagccaaa ctcctctgc ctgccagca gcccttccag ccccagcctt ttacgccaca
2041 gccctaccag cccatgcagc cccagccacc tgtgcaacc atgcagcccc tgcgccaca
2101 gccactctg cctccaatgt tcccctgcg gccctgccc cccatactc ctgatctgca
2161 tctggaagct tggccagcaa cagacaagac caagcaggag gaagtggfga gtacacctg
2221 aagccactac aatgcaaatc ctgtgaaaat ggtgcagcaa agttggcccc agagtctaa
2281 ggggtccaac aactcagggt ctagagttgt agtagttaca gatctatgat tctattatg
2341 caagtaatat gttgtatctt tacattataa acaaatatt cttaatggct tggtaattaa
2401 gaacacagtt ttatgatag gtttaaatf tattattatt gaattctac cagactgat
2461 attatgacaa cccattaata gaaaaatata ttattaaacc ctcttaatt taagggcaac
2521 agcaataagg gaatatcagt tctttcattt caaagatttg actcacaaga agaggctaga
2581 atgcagtga aggcttaaga taagatgggg tggtaattt tttagtgca tatattgaa
2641 caagctatga aaggtatag ggaatctct ttaaaaaac ctatacgaag gtttccatt
2701 ttcagtagtt ttcagctaa ctggaggag gctaaactaa acatgctgtt agagtcttt
2761 ttatgtctga gattctatag atgattaagc ttttaaaaag aagttaccic aatttatgac
2821 tgaatctccc attacaagaa gcacttacia atgaatggga ataactaata aaaaaactt
2881 atccacatcc ataaaaactt atttctact atataagatt atgtgatcta tcaattat
2941 gtatccaact gtaattccaa ttatacaag ctattgatga tatactactg agaagcagag
3001 aaaaagttagg tggaaatgac caggatagac agccaggaca gctagggtca agttctggct
3061 ttcccctcaa aaggaggcca ctattgtaa agttactca aatgtgtgag tattttctg
3121 tcttttaaa gggggaaaa gacaaaatca gatcattttc aagcctctga ccaggataa
3181 atgtgataac ttctgaatta aaaaatcata atatatgta taaatggctt aataattgtg
3241 agcatgtta cagagaatat gggcagaat t

ภาคผนวก จ

ตำแหน่งจับของ Primer บนสายดีเอ็นเอ Template

Sequence of primer design

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

(สาย Complementary)

1 acatagcaca cttgttttaa cgaaaaacag acctcaaata tattctgtac tatatagatt
61 ttttaaaagt aattttagtc tctctaatg ttaacaattg catattgact taatctctta
121 ctctctcttc ccttcttca cactctcct tctctctct tctctctc ctcccctct
181 ccctataaaa gctaccacct catcctgggc accctggta tatcaactc agctatgagg
241 taattttct cttfactaat ttgatcact gttgcatta gcagtccct gggctctgta

F3

301 aagaatagtg ggtggattct tcatccaaa taaagtgggt tctcaagtgg tccaatttt

F2

361 acagttccta ccatcagctt **cccagtttaa gctctgatgg ttggcctcaa** gcctgtgttg

F1c

B1c

421 ctccagcacc **ctcctgctg accattcgga ttgactcttt cctcctaaat atggctgtaa**
aatccgaa tggtcaggca gg

B2

B3

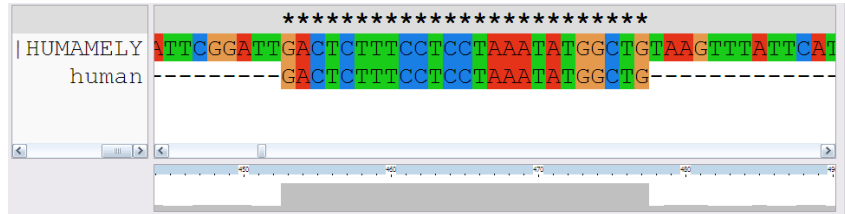
481 gtttattcat tcatgaacca ctgctcagga aggttccatg aaagggcaaa aagtcaactc

tttgccc tttcatggaa c **ctggtcag**

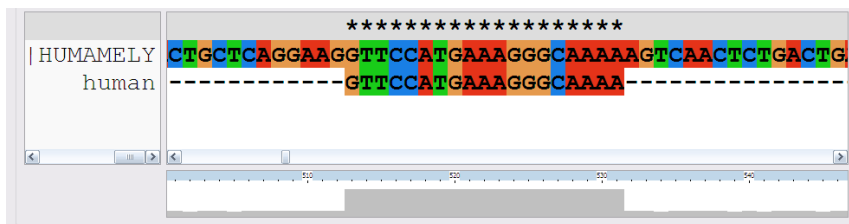
541 **tgactgacca gcttggttct atccatccg gtaaaatgta aagattaggt** aaaattacta
tcagagttga c

ภาคผนวก จ

Alignment Primer by ClustalX2



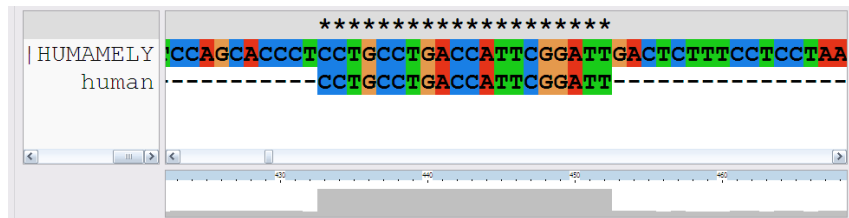
ภาพ 22 Alignment Primer B1c and Amel Y



ภาพ 23 Alignment Primer B2 and Amel Y



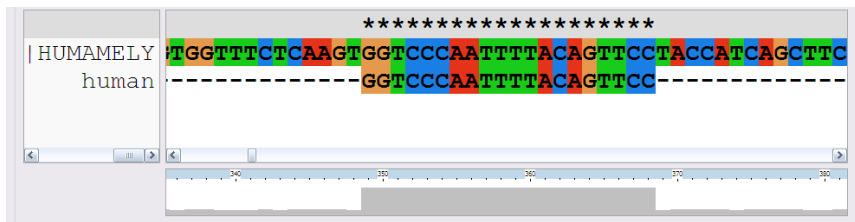
ภาพ 24 Alignment Primer B3 and Amel Y



ภาพ 25 Alignment Primer F1c and Amel Y



ภาพ 26 Alignment Primer F2 and Amel Y



ภาพ 27 Alignment Primer F3 and Amel Y

ภาคผนวก ข

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

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	นายจิรายุทธ์ ว่างตา
วัน เดือน ปี เกิด	19 มีนาคม 2531
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนพิริยาลัยจังหวัดแพร่ ปีการศึกษา 2545 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพิริยาลัยจังหวัดแพร่ ปีการศึกษา 2548 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2552