

บรรณานุกรม

- Abid S, Zili M, Bouzid L, *et al.* (2001) "Gene frequencies of human neutrophil antigens in the Tunisian blood donors and Berbers" *Tissue Antigens*. 58(2): page 90-2.
- Abou-Chaker K, Meyer O and Salama A. (2009) "Rapid typing of the human neutrophil antigen 1a by the particle gel agglutination assay" *Tissue Antigens*. 73(3): page 242-4.
- Bruin M, Dassen A, Pajkrt D, Buddelmeyer L, Kuijpers T and de Haas M. (2005) "Primary autoimmune neutropenia in children: a study of neutrophil antibodies and clinical course" *Vox Sang*. 88(1): page 52-9.
- Bux J. (1996) "Autoimmune neutropenia" *Dtsch Med Wochenschr*. 121(9): page 287.
- Bux J. (1996) "Challenges in the determination of clinically significant granulocyte antibodies and antigens" *Transfus Med Rev*. 10(3): page 222-32.
- Bux J. (2001) "Granulocyte immunology" *Wien Klin Wochenschr*. 113(20-21): page 799-805.
- Bux J. (2001) "Molecular nature of granulocyte antigens" *Transfus Clin Biol*. 8(3): page 242-7.
- Bux J. (2002) "Molecular nature of antigens implicated in immune neutropenias" *Int J Hematol*. 76(Suppl 1): page 399-403.
- Bux J. (2008) "Human neutrophil alloantigens" *Vox Sang*. 94(4): page 277-85.
- Bux J, Behrens G, Jaeger G and Welte K. (1998) "Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases" *Blood*. 91(1): page 181-6.
- Bux J and Chapman J. (1997) "Report on the second international granulocyte serology workshop" *Transfusion*. 37(9): page 977-83.
- Bux J, Kober B, Kiefel V and Mueller-Eckhardt C. (1993) "Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens" *Transfus Med*. 3(2): page 157-62.
- Bux J, Stein EL, Santoso S and Mueller-Eckhardt C. (1995) "NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers" *Transfusion*. 35(1): page 54-7.
- Capsoni F, Sarzi-Puttini P and Zanella A. (2005) "Primary and secondary autoimmune neutropenia" *Arthritis Res Ther*. 7(5): page 208-14.

- Cardone JD, Bordin JO, Chiba AK, Norcia AM and Vieira-Filho JP. (2006) "Gene frequencies of the HNA-4a and -5a neutrophil antigens in Brazilian persons and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-5a genotyping" *Transfusion*. 46(9): page 1515-20.
- Caruccio L, Bettinotti M, Matsuo K, Sharon V and Stroncek D. (2003) "Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy" *Transfusion*. 43(3): page 357-63.
- Changsri K, Tobunluepop P, Songthammawat D, Apornsuwan T, Kaset C and Nathalang O. (2014) "Human neutrophil alloantigen genotype frequencies in Thai blood donors" *Blood Transfus*. 12(Suppl 1): page 1-6.
- Chu CC, Lee HL, Chu TW and Lin M. (2001) "The use of genotyping to predict the phenotypes of human platelet antigens 1 through 5 and of neutrophil antigens in Taiwan" *Transfusion*. 41(12): page 1553-8.
- Chu HT, Lin H, Tsao TT, *et al.* (2013) "Genotyping of human neutrophil antigens (HNA) from whole genome sequencing data" *BMC Med Genomics*. 6(1): page 31.
- Costa E, Antunes MB, Faria S, *et al.* (2004) "Determination of neutrophil Fc γ receptor IIIb antigens (HNA-1a, HNA-1b and HNA-1c) by fluorescence-primed allele-specific polymerase chain reaction" *Clin Lab Haematol*. 26(5): page 319-21.
- Curtis BR, Reno C and Aster RH. (2005) "Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil alloantigen HNA-1c (SH): a report of five cases" *Transfusion*. 45(8): page 1308-13.
- Davoren A, Curtis BR, Shulman IA, *et al.* (2003) "TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities" *Transfusion*. 43(5): page 641-5.
- Davoren A, Saving K, McFarland JG, Aster RH and Curtis BR. (2004) "Neonatal neutropenia and bacterial sepsis associated with placental transfer of maternal neutrophil-specific autoantibodies" *Transfusion*. 44(7): page 1041-6.
- de Haas M, Kleijer M, van Zwieten R, Roos D and von dem Borne AE. (1995) "Neutrophil Fc γ receptor IIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families" *Blood*. 86(6): page 2403-13.

- de La Vega Elena CD, Nogues N, Fernandez Montoya A, Oyonarte S, Solis E and Muniz-Diaz E. (2008) "HNA-1a, HNA-1b and HNA-1c gene frequencies in Argentineans" *Tissue Antigens*. 71(5): page 475-7.
- Decary F, Verheugt FW, van Helden-Henningheim L, *et al.* (1979) "Recognition of a non-HLA-ABC antigen present on B and T lymphocytes and monocytes only detectable with the indirect immunofluorescence test" *Vox Sang*. 36(3): page 150-8.
- Fadeyi EA, De Los Angeles Muniz M, Wayne AS, Klein HG, Leitman SF and Stroncek DF. (2007) "The transfusion of neutrophil-specific antibodies causes leukopenia and a broad spectrum of pulmonary reactions" *Transfusion*. 47(3): page 545-50.
- Flesch BK, Doose S, Siebert R, Ntambi E and Neppert J. (2002) "FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a, -1b, and -1c in the populations of northern Germany and Uganda" *Transfusion*. 42(4): page 469-75.
- Foster CB, Lehrnbecher T, Mol F, *et al.* (1998) "Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease" *J Clin Invest*. 102(12): page 2146-55.
- Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, *et al.* (1992) "Frequency of the polymorphonuclear neutrophil Fc gamma receptor III deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia" *Blood*. 79(8): page 2131-4.
- Fung YL, Goodison KA, Wong JK and Minchinton RM. (2003) "Investigating transfusion-related acute lung injury (TRALI)" *Intern Med J*. 33(7): page 286-90.
- Fung YL, Pitcher LA, Willett JE, *et al.* (2003) "Alloimmune neonatal neutropenia linked to anti-HNA-4a" *Transfus Med*. 13(1): page 49-52.
- Goldschmeding R, van Dalen CM, Faber N, *et al.* (1992) "Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils" *Br J Haematol*. 81(3): page 336-45.
- Gottschall JL, Triulzi DJ, Curtis B, *et al.* (2011) "The frequency and specificity of human neutrophil antigen antibodies in a blood donor population" *Transfusion*. 51(4): page 820-7.
- Greinacher A, Wesche J, Hammer E, *et al.* (2010) "Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a" *Nat Med*. 16(1): page 45-8.

- Hadley AG, Holburn AM, Bunch C and Chapel H. (1986) "Anti-granulocyte opsonic activity and autoimmune neutropenia" *Br J Haematol.* 63(3): page 581-9.
- Hadley AG, Poole GD, Amphlett NW and Lucas GF. (1992) "The use of interferon-gamma-treated U937 cells in chemiluminescence assays to detect red cell, platelet and granulocyte antibodies of potential clinical significance" *Clin Lab Haematol.* 14(4): page 315-26.
- Han KS and Um TH. (1997) "Frequency of neutrophil-specific antigens among Koreans using the granulocyte indirect immunofluorescence test (GIFT)" *Immunohematology.* 13(1): page 15-6.
- Han TH, Chey MJ and Han KS. (2006) "A case of neonatal alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-1a (HNA-1a) antibody" *J Korean Med Sci.* 21(2): page 351-4.
- Han TH, Chey MJ and Han KS. (2006) "Granulocyte antibodies in Korean neonates with neutropenia" *J Korean Med Sci.* 21(4): page 627-32.
- Han TH and Han KS. (2006) "Gene frequencies of human neutrophil antigens 4a and 5a in the Korean population" *Korean J Lab Med.* 26(2): page 114-8.
- Hauck B, Philipp A, Eckstein R, *et al.* (2011) "Human neutrophil alloantigen genotype frequencies among blood donors with Turkish and German descent" *Tissue Antigens.* 78(6): page 416-20.
- Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ and Aster RH. (1996) "Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers" *Transfusion.* 36(10): page 895-9.
- Hillyer C, Silberstein L, Ness P, Anderson K and Roback J. (2007) Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principle & Practice. Human leukocyte and granulocyte antigens and antibodies: the HLA and HNA systems. Wang E, Adams S, Marincola F and Stroncek D. Philadelphia, Churchill Livingstone: page 129-56.
- Huizinga TW, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D and von dem Borne AE. (1990) "Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils" *J Clin Invest.* 86(2): page 416-23.

- Huizinga TW, Kleijer M, Tetteroo PA, Roos D and von dem Borne AE. (1990) "Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc gamma receptor III (CD16)" *Blood*. 75(1): page 213-7.
- Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, Daniels G and Bux J. (2000) "HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese" *Tissue Antigens*. 56(2): page 143-8.
- Kissel K, Santoso S, Hofmann C, Stroncek D and Bux J. (2001) "Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions" *Eur J Immunol*. 31(5): page 1301-9.
- Kline WE, Press C, Clay M, Keashen-Schnell M, Hackel E and McCullough J. (1986) "Three sera defining a new granulocyte-monocyte-T-lymphocyte antigen" *Vox Sang*. 50(3): page 181-6.
- Koene HR, Kleijer M, Roos D, de Haas M and von dem Borne AE. (1998) "Fc gamma RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc gamma RIIIB genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals" *Blood*. 91(2): page 673-9.
- Kupatawintu P, Pheanchaen S, Srisuddee A, Tanaka H, Tadokoro K and Nathalang O. (2010) "HLA-A, -B, -DR haplotype frequencies in the Thai Stem Cell Donor Registry" *Tissue Antigens*. 75(6): page 730-6.
- Lalezari P and Bernard GE. (1965) "Identification of a specific leukocyte antigen: another presumed example of 5b" *Transfusion*. 5(2): page 135-42.
- Lalezari P. (1977) "Neutrophil antigens: immunology and clinical implications" *Prog Clin Biol Res*. 13: page 209-25.
- Lalezari P, Murphy GB and Allen FH. (1971) "NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia" *J Clin Invest*. 50(5): page 1108-15.
- Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, *et al.* (1999) "Variant genotypes of the low-affinity Fc gamma receptors in two control populations and a review of low-affinity Fc gamma receptor polymorphisms in control and disease populations" *Blood*. 94(12): page 4220-32.
- Lucas G, Rogers S, de Haas M, Porcelijn L and Bux J. (2002) "Report on the Fourth International Granulocyte Immunology Workshop: progress toward quality assessment" *Transfusion*. 42(4): page 462-8.

- Lucas G, Rogers S, Evans R, Hambley H and Win N. (2000) "Transfusion-related acute lung injury associated with interdonor incompatibility for the neutrophil-specific antigen HNA-1a" *Vox Sang.* 79(2): page 112-5.
- Lucas GF. (1994) "Prospective evaluation of the chemiluminescence test for the detection of granulocyte antibodies: comparison with the granulocyte immunofluorescence test" *Vox Sang.* 66(2): page 141-7.
- Lucas GF and Metcalfe P. (2000) "Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms" *Transfus Med.* 10(3): page 157-74.
- Marin L, Torio A, Muro M, *et al.* (2005) "Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies" *Pediatr Allergy Immunol.* 16(3): page 279-82.
- Matsuo K, Procter J and Stroncek D. (2000) "Variations in genes encoding neutrophil antigens NA1 and NA2" *Transfusion.* 40(6): page 645-53.
- Moritz E, Norcia AM, Cardone JD, *et al.* (2009) "Human neutrophil alloantigen systems" *An Acad Bras Cienc.* 81(3): page 559-69.
- Nagarajan S, Chesla S, Cobern L, Anderson P, Zhu C and Selvaraj P. (1995) "Ligand binding and phagocytosis by CD16 (Fc gamma receptor III) isoforms. Phagocytic signaling by associated zeta and gamma subunits in Chinese hamster ovary cells" *J Biol Chem.* 270(43): page 25762-70.
- Norcia AM, Sugano EY, Chiba AK, *et al.* (2009) "Human neutrophil alloantigen-1a, -1b, -2, -3a and -4a frequencies in Brazilians" *Tissue Antigens.* 74(5): page 404-7.
- Nordhagen R, Conradi M and Dromtorp SM. (1986) "Pulmonary reaction associated with transfusion of plasma containing anti-5b" *Vox Sang.* 51(2): page 102-7.
- Pocock CF, Lucas GF, Giles C, *et al.* (2001) "Immune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies following unrelated donor stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia: perpetuation by granulocyte colony-stimulating factor" *Br J Haematol.* 113(2): page 483-5.
- Ravetch JV and Perussia B. (1989) "Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions" *J Exp Med.* 170(2): page 481-97.

- Reil A, Wesche J, Greinacher A and Bux J. (2011) "Geno- and phenotyping and immunogenicity of HNA-3" *Transfusion*. 51(1): page 18-24.
- Romphruk AV, Puapairoj C, Romphruk A, Barasrux S, Urwijitaroon Y and Leelayuwat C. (1999) "Distributions of HLA-DRB1/DQB1 alleles and haplotypes in the north-eastern Thai population: indicative of a distinct Thai population with Chinese admixtures in the central Thais" *Eur J Immunogenet*. 26(2-3): page 129-33.
- Sachs UJ, Reil A, Bauer C, Bux J, Bein G and Santoso S. (2005) "Genotyping of human neutrophil antigen-5a (Ond)" *Transfus Med*. 15(2): page 115-7.
- Salmon JE, Edberg JC and Kimberly RP. (1990) "Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities" *J Clin Invest*. 85(4): page 1287-95.
- Silliman CC, Curtis BR, Kopko PM, *et al.* (2007) "Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model" *Blood*. 109(4): page 1752-5.
- Silliman CC, Fung YL, Ball JB and Khan SY. (2009) "Transfusion-related acute lung injury (TRALI): current concepts and misconceptions" *Blood Rev*. 23(6): page 245-55.
- Simsek S, van der Schoot CE, Daams M, *et al.* (1996) "Molecular characterization of antigenic polymorphisms (Ond(a) and Mart(a)) of the beta 2 family recognized by human leukocyte alloantisera" *Blood*. 88(4): page 1350-8.
- Steffensen R, Gulen T, Varming K and Jersild C. (1999) "Fc gamma RIIB polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in the Danish population" *Transfusion*. 39(6): page 593-8.
- Stroncek D. (2002) "Neutrophil alloantigens" *Transfus Med Rev*. 16(1): page 67-75.
- Stroncek D and Bux J. (2002) "Is it time to standardize granulocyte alloantigen nomenclature?" *Transfusion*. 42(4): page 393-5.
- Tsuno H, Matsuhashi M and Takahashi K. (2011) "Granulocyte antibody detection – the role of MPHA" *ISBT Science Series*. 6: page 387-90.
- Van Leeuwen A, Eernisse JG and Van Rood JJ. (1964) "A New Leucocyte Group with Two Alleles: Leucocyte Group Five" *Vox Sang*. 9(4): page 431-46.

Velickovic Z. (2010). "Tissue typing: method" [Online]. Available:

http://www.tissuetyping.org.au/tt_methods.html [2010, January]

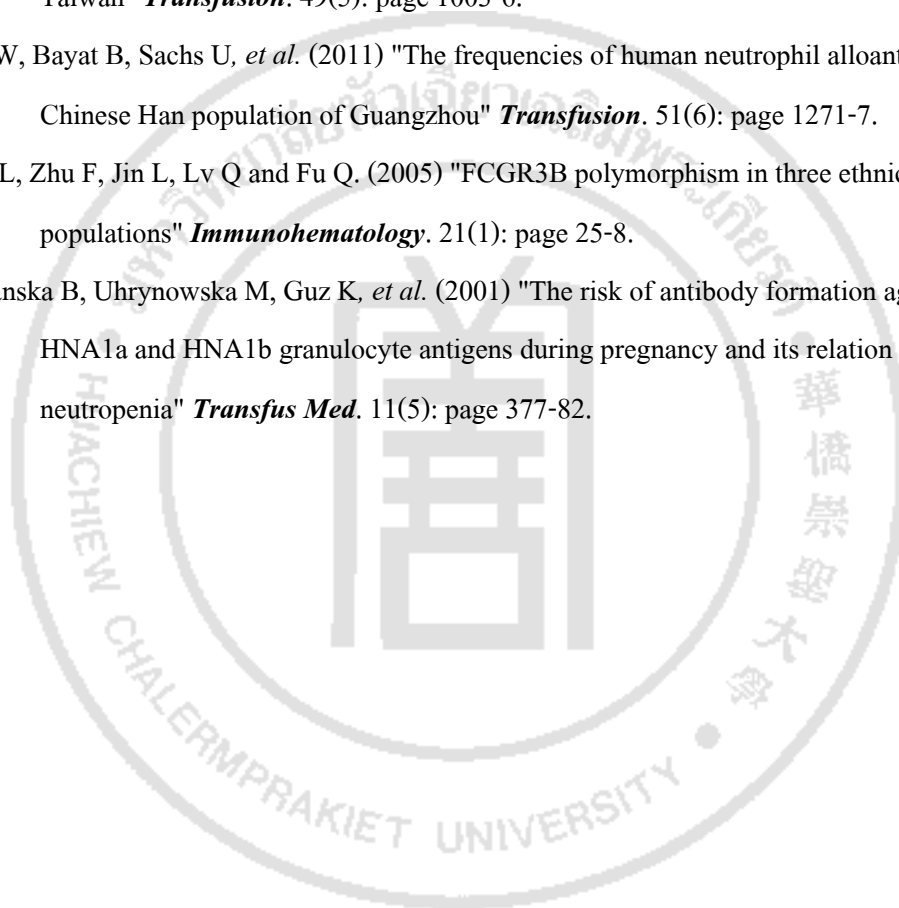
Verheugt FW, von dem Borne AE, Decary F and Engelfriet CP. (1977) "The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test" *Br J Haematol.* 36(4): page 533-44.

Wang LY, Wang CL, Chu CC, *et al.* (2009) "Primary autoimmune neutropenia in children in Taiwan" *Transfusion.* 49(5): page 1003-6.

Xia W, Bayat B, Sachs U, *et al.* (2011) "The frequencies of human neutrophil alloantigens in the Chinese Han population of Guangzhou" *Transfusion.* 51(6): page 1271-7.

Yan L, Zhu F, Jin L, Lv Q and Fu Q. (2005) "FCGR3B polymorphism in three ethnic Chinese populations" *Immunohematology.* 21(1): page 25-8.

Zupanska B, Uhrynowska M, Guz K, *et al.* (2001) "The risk of antibody formation against HNA1a and HNA1b granulocyte antigens during pregnancy and its relation to neonatal neutropenia" *Transfus Med.* 11(5): page 377-82.



ภาคผนวก ก.

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.1 Disposable pipette tips 10 μ l (Cat no.2GB-200200, Bioline, Finland)
- 1.2 Disposable pipette tips 0.2 μ l (Cat no.2GB-200200, Bioline, Finland)
- 1.3 Glove (Cat no. FE 0788, Dr.Boo Co., Thailand)
- 1.4 Microcentrifuge tube, 1.5 ml (Cat no.801500, Bioline, Finland)
- 1.5 PCR tube, 0.2 ml (Cat no.60082, Bioline, Finland)
- 1.6 PCR plate, 96 wells (Cat no.749C7-7362, Labcon Petaluma, CA, USA)
- 1.7 Pipette tips 200 μ l (Cat no.2GB-200200, Bioline, Finland)
- 1.8 Pasture pipette

2. เครื่องมือที่ใช้

- 2.1 Autoclave (SX-700, Tomy, Meditop Co., Ltd.)
- 2.2 Autopipette
- 2.3 Centrifuge (Table-top centrifuge, Kokusan, Japan)
- 2.4 Electrophoresis system (Mupid-exu, Advance, Japan)
- 2.5 Freezer -20 °C (SF-C1497 (GYN), SANYO, บริษัท ชันโยคอมเมอร์เชียลโซลูชั่นไทยแลนด์ จำกัด ประเทศไทย)
- 2.6 Gel document (UV Transluminator, vilber lourmat, France)
- 2.7 Microcentrifuge (Hsiangtai, Lio Lab, Thailand)
- 2.8 Mixer, Vortex (Genie 2, Vortex, พี.อินเตอร์เทรด อีควิปเมนท์ จำกัด, ประเทศไทย)
- 2.9 Microwave (M1711N, Samsung บริษัท ไทยซัมซุง อิเล็กทรอนิกส์ จำกัด, ประเทศไทย)
- 2.10 Refrigerator 4 °C (SBC-2DB, SANYO, บริษัท ชันโยคอมเมอร์เชียลโซลูชั่นไทยแลนด์ จำกัด ประเทศไทย)

2.11 Thermal cycle (Mastervapo.protect, Eppendorf, Germany)

3. นํ้ายาและสารเคมี

3.1 Agarose gel (Cat no. 0000093376, Vivantis, Malaysia)

3.2 Ammonium sulfate

3.3 Boric acid (CAS # 203667, Merck, Germany)

3.4 Citric acid

3.5 Dextrose (monohydrate)

3.6 dNTPs (Lot no.4068, Vivantis, Malaysia)

3.7 EDTA (Lot no.8P001784, Applichem, Germany)

3.8 Ethidium bromide (Cat no.1376B017, Vivantis, Malaysia)

3.9 Guanidine Thiocyanate (CAS # 593840, Bio Basic inc., Canada)

3.10 HCl

3.11 MgCl₂ (Lot no.2038, Vivantis, Malaysia)

3.12 MgCl₂.6H₂O

3.13 Primer (Bio Basic inc., Canada)

3.14 Sodium Chloride (Cat no. 1208303, Univar, ajaxfinechem Pty Ltd., Australia)

3.15 Sodium-N-Lauroyl Sarcosinate

3.16 Steriled distill water

3.17 Sucrose (CAS# 57501, Bio Basic inc., Canada)

3.18 *Taq* polymerase (Lot no.2122-02, Vivantis, Malaysia)

3.19 Tris base (Cat no.9680T, Research organics, USA)

3.20 Tri-sodium (dehydrate) citrate

3.21 Triton X-100 (Lot no. 430308/1 24601, Fluka Chemika, Switzerland)

3.22 Tween-20

3.23 1X loading dye (Lot no.326281/11193, Fluka Chemika, Germany)

3.24 2-Mercaptoethanol (CAS # 80242, Applichem, Germany)

3.25 70%alcohol (Cat no. 700472, ศิริปัญญา, Thailand)

ภาคผนวก ข.
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย

1.1 การเตรียม 5 M NaCl (500 มล.)

| | | | |
|------|------|-------|------|
| ชั่ง | NaCl | 146.1 | กรัม |
|------|------|-------|------|

- ละลาย NaCl ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี

1.2 การเตรียม 1M MgCl₂.6H₂O (1,000 มล.)

| | | | |
|------|--------------------------------------|-------|------|
| ชั่ง | MgCl ₂ .6H ₂ O | 203.3 | กรัม |
|------|--------------------------------------|-------|------|

- ละลาย MgCl₂.6H₂O ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มล.
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี

1.3 การเตรียม 0.5M EDTA pH 8.0 (500 มล.)

| | | | |
|------|------|-------|------|
| ชั่ง | EDTA | 93.06 | กรัม |
|------|------|-------|------|

- ละลาย EDTA ในน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.
- คนให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer
- ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 8.0 ด้วยสาร NaOH
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี

1.4 การเตรียม 1M Tris-HCl pH 7.5 (500 มล.)

| | | | |
|------|-----------|-------|------|
| ชั่ง | Tris base | 30.25 | กรัม |
|------|-----------|-------|------|

- ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.
- ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 7.5 ด้วยสาร HCl
- วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารละลายเย็นลงแล้วจึงปรับ pH อีกครั้ง
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1 การเตรียม 5x Red cell lysis buffer (5x RCLB)

| | | | |
|------|---|-----|------|
| ชั่ง | Sucrose | 547 | กรัม |
| ตวง | Triton X-100 | 50 | มล. |
| ตวง | 1M MgCl ₂ .6H ₂ O | 25 | มล. |
| ตวง | 1M Tris-HCl pH 7.5 | 60 | มล. |

- ละลาย sucrose ในน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มล.
- ใส่ส่วนประกอบที่เหลือ (TritonX-100, MgCl₂.6H₂O และ Tris-HCl) ลงไปสารละลาย sucrose
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

* Working solution (1x RCLB) เตรียมได้จากการละลาย 5X RCBL ปริมาตร 100 มล. กับ น้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.

2.2 การเตรียม Nuclear membrane lysis buffer (NMLB) (800 มล.)

| | | | |
|------|------------------------------|-------|------|
| ชั่ง | Guanidine Thiocyanate | 378.1 | กรัม |
| ตวง | 1M Tris-HCl, pH 7.6 | 9.6 | มล. |
| ตวง | 0.5M EDTA, pH 8.0 | 19.2 | มล. |
| ตวง | 5M NaCl | 60 | มล. |
| ตวง | 2-Mercaptoethanol | 5.6 | มล. |
| ชั่ง | Sodium-N-Lauroyl Sarcosinate | 4 | กรัม |

- ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.3 การเตรียม 1x TE-buffer (200 มล.)

| | | | |
|-----|--------------------|-----|-----------|
| ตวง | 1M Tris-HCl pH 7.5 | 0.5 | มล. |
| ตวง | 0.5M EDTA | 100 | ไมโครลิตร |

- ผสมสารละลายทั้งสองกับน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม PCR Amplification solutions

3.1 การเตรียม 10X PCR buffer

| | | | |
|------|------------------|--------|------|
| ชั่ง | Tris base | 40.568 | กรัม |
| ชั่ง | Ammonium sulfate | 10.96 | กรัม |
| ตวง | Tween-20 | 5 | มล. |

- ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.
- ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 8.8 ด้วยสาร HCl
- เติมสาร Ammonium sulfate ลงในสารละลาย

- นำสารละลายไปกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 μM
- เติม Tween-20 ลงในสารละลายและปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$

4. การเตรียม Electrophoretic analysis solutions

4.1 การเตรียม 10x TBE buffer (stock solution) (1000 มล.)

| | | | |
|------|------------------|-----|------|
| ชั่ง | Tris base | 108 | กรัม |
| ชั่ง | Boric acid | 55 | กรัม |
| ตวง | 0.5M EDTA pH 8.0 | 40 | มล. |

- ละลาย Tris base และ Boric acid ในน้ำกลั่น ปริมาตร 700 มล.
- เติม EDTA ลงไปในสารละลายและปรับให้ได้ปริมาตร 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

* Working solution (0.5 X TBE) เตรียมได้จากการละลาย 10X TBE ปริมาตร 50 มล. กับ น้ำกลั่น ปริมาตร 950 มล.

4.2 การเตรียม 50mg% Ethidium bromide solutions (20 มล.)

| | | | |
|------|------------------|----|------|
| ชั่ง | ethidium bromide | 10 | กรัม |
| ตวง | PBS, pH 7.4 | 18 | มล. |

- ละลาย ethidium bromide และ PBS ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 2 มล.
- คนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งแน่ใจว่าละลายหมดแล้ว
- เก็บในขวดสีชาหรือใช้ aluminum foil พันรอบขวดและเก็บที่อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

ภาคผนวก ค.
ประวัติย่อผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวฉันทดา กองมะเร็ง

(ภาษาอังกฤษ) Miss Chalunda Kongmaroeng

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก) มหาวิทยาลัยมหิดล

ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตำแหน่ง

อาจารย์ประจำ

สถานที่ทำงาน

กลุ่มวิชาการโรคโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

โทรศัพท์ 02-3126300 ต่อ 1221

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางเกษร คำแก่น

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Kesorn Kumkaen

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ตำแหน่ง

นักเทคนิคการแพทย์ ระดับชำนาญการ

สถานที่ทำงาน

ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก

โรงพยาบาลระยอง อ.เมือง จ.ระยอง

โทรศัพท์ 038-611104 ต่อ 2079, 2080