ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1. phosphate buffer saline (PBS) ,pH = 7.4

สารละลาย ก. NaH_2PO_4 .$2H_2O$	78.004	กรัม/น้ำ 1 ลิตร
สารละลาย ข. Na_2HPO_4 . 12 H_2O	35.814	กรัม/น้ำ 1 ลิตร
สารละลาย ค. NaCl	61.365	กรัม
Thimerasal	0.75	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำสารละลาย ก. 6.66 มล. ผสมกับสารละลาย ข. 66.87 มล. ผสมกับสารละลาย ค. 133.30 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 900 มล. เติมสารละลายเจลลาติน 1 กรัมด้วยน้ำอุ่นประมาณ 50 มล. คนให้เข้ากัน ปรับpH =7.4 ด้วย NaOH 1 *N*. จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร.

2. Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

Iscove's Modified Dulbecco's Medium	17.7	กรัม
$NaHCO_3$	3.024	กรัม
Pennicillin G	100	unit/มล.
Gentamycin	100	µl

ละลาย IMDM 17.7 กรัม และ $NaHCO_3$ 3.024 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับpH=7.4 ด้วยNaOH 1 N. เติม Penicillin และ Gentamycin จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองสารละลายด้วย Filter membrane ขนาดรูที่ผ่านได้ 0.2 ไมครอน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มม. ใช้กรวย Filtration assembly ที่ประกอบเข้ากับ Side-arm flask ขนาด 1 ลิตร กรองด้วยอาศัยเครื่องดูดสุญญากาศ (vaccum pump) ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ.

3. 10% fetal bovine serum (FBS)

นำ fetal bovine serum แช่ลงในอ่างน้ำร้อนที่ 56°ซ นาน 30 นาที แล้วแบ่งออกเป็นส่วนส่วนละ 10 มล. เก็บไว้ที่ -20° ซ เพื่อนำไปใช้ต่อไป

10% FBS ใน IMDM ประกอบด้วย FBS 10 มล. เติม IMDM 90 มล. ภายใต้สภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บในอุณหภูมิ 4°ซ ก่อนใช้งานควรอุ่นที่ 37°ซ.

4. สารละลาย HAT (hypoxanthine,Aminopterin และ thymidine) (X100)

นำ HAT (X100) 1 มล.เติม 10 % FBS ใน IMDM 99 มล. ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เก็บที่ 4°ซ ก่อนใช้งานควรอุ่นที่ 37°ซ.

5. สารละลาย HT (hypoxanthine และ thymidine) (Schelling,1995)

สารละลาย HT ความเข้มข้น 100 เท่า (X100) ประกอบด้วย Hypoxanthine (X100) 13.6 มก.ละลายใน IMDM 8 มล. ค่อยๆเติม 1 *N* NaOH จนกระทั่ง Hypoxanthine ละลายหมด จึงเติม Thymidine (X100) 7.6 มก. แล้วปรับ pH=9.5 ด้วยกรดอะซิติก นำไปกรองด้วย Filter mambrane (0.2 ไมครอน) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

นำสารละลาย HT (X100) 1 มล. เติม 10%FBS ใน IMDM 99 มล. ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เก็บที่ -20°ซ ก่อนใช้งานควรอุ่นที่ 37°ซ.

6. สารละลายที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์ (fusion solution)

สารละลาย 50 % polyethylene glycol (PEG) ประกอบด้วย polyethylene glycol (Sigma,P3640) มวลโมเลกุล 3,350 ปริมาณ 2 กรัม เติม IMDM 2 มล. แล้วนำไป อบฆ่าเชื้อ ภายใต้ความดัน (Autoclave)

สารละลาย 7.5 % dimethyl sulfoxide ประกอบด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Art.802912) 7.5 มล. เติม IMDM ให้ปริมาตรครบ 100 มล.

fusion solution ประกอบด้วยอัตราส่วน 50% PEG: 7.5% DMSO = 1 : 2

7. 2-Mercaptoethanol (2-ME) (Sigma,M6250) (Davis and Hamilton,1995)

สารละลาย 2-ME (X1000) 0.035 มล.เติม IMDM ให้ปริมาตรครบ 10 มล.($5x10^{-5}$M) เก็บไว้ที่ 4 °ซ นำสารละลาย 2-ME (x1000) 1 มล. ใน IMDM 1 ลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ.

8. สารละลาย coating Buffer (carbonate/bicarbonate buffer (0.05M)), pH = 9.6

Na_2CO_3	4.29	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
Thimerasal	0.20	กรัม

เติมน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH=9.6 ด้วย 1 *N* NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บที่ 4 °ซ.

9. PBS-Tween Buffer (washing buffer)

polyethylenesorbitan monolaurate (Tween 80) 500 ไมโครลิตร เติม PBS ให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร คนให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. สารละลาย 1% BSA

ละลาย bovine serum albumin 1 กรัม ใน coating buffer 100 มล. เตรียมเมื่อต้องการใช้งาน

11. citrate-phosphate buffer pH=5.0

Citric acid (monohydrate)	10.30	กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	18.16	กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH=5.0 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 1 *N* HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร.

12. สารละลายหยุดปฏิกิริยา (stoping solution)

4 *N* H_2SO_4 ประกอบด้วยเติม H_2SO_4 (98%) 21.36 มล. ลงไปในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

13. UltraDOMA-PF media

Ultradoma media	16.9	กรัม
$NaHCO_3$	3.024	กรัม
Pennicillin G	100	unit/มล.
Gentamycin	100	µl

ละลายในน้ำกลั่น 2 ครั้ง 800-900 มล. ปรับpH= 7.4 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 1 *N* HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เติม Penicillin และ Gentamycin จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองสารละลายด้วย Filter membrane ขนาดรูที่ผ่านได้ 0.2 ไมครอน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มม. ใช้กรวย filtration assembly ที่ประกอบเข้ากับ side-arm flask ขนาด 1 ลิตร กรองด้วยอาศัยเครื่องดูดสูญญากาศ ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ.

14. การเตรียม dialysing tube

ตัด dialysing tube ความยาวตามความต้องการที่จะใช้งาน แช่น้ำกลั่น นานประมาณ 10 นาที และนำไปต้มในสารละลาย EDTA 10 mM. ที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 30 นาที 3 ครั้ง (EDTA ใหม่ทุกครั้ง) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 10 mM. ที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 30 นาที แล้วต้มในน้ำกลั่น นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 10 นาที และเก็บไว้ในเอธานอล (ethanol) ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์.

15. สารละลายกัมมันตคาร์บอน (charcoal suspension)

เด็กแตรน โซเดียมซัลเฟต (Dextran sodium sulfate)	0.0625	กรัม
ผงกัมมันตคาร์บอน (Charcoal activated)	0.625	กรัม
น้ำกลั่น	100	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำไปปั่นที่ 4 °ซ นานประมาณ 2 ชั่วโมง.

16. สารละลายสำหรับวัดพลังงานรังสี หรือ ซินทิเลเตอร์ (scintillator)

เตรียมจากละลาย สารพี-เทอร์ฟีนิล (p-terphenyl) 3 กรัม และ พีโอพีโอพี (POPOP) 0.1 กรัม ในโทลูอีน (Toluene) 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 คืนก่อนใช้งาน.

17. สารละลายฮอร์โมนอีสตราไดออลที่ติดฉลากด้วยตริเตรียม

สารละลายฮอร์โมนอีสตราไดออลที่ติดฉลากด้วยตริเตรียม [(1,2,6,7-^{3}H) estradiol,^{3}H-E2] เตรียมได้โดยเจือจางฮอร์โมนอีสตราไดออลที่ติดฉลากด้วยตริเตรียม ที่มีความเข้มข้น 250 ไมโครคิวรี่ ด้วยเอธานอล 100 มล. และเจือจางด้วยสารละลายพีบีเอส วัดค่าพลังงานรังสีให้ได้ประมาณ 6,000 ครั้งต่อนาที (count per minute,cpm).

18. สารละลายที่ใช้สำหรับ thiophilic gel chromatography (thiophilic gel chromatography buffer)

สารละลาย ก.

Tris-HCL	12	กรัม
K_2SO_4	87	กรัม

นำส่วนประกอบละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH= 7.6 แล้วปรับปริมาตราให้เป็น 1 ลิตร.

สารละลาย ข.

Tris-HCL	12	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH= 7.6 แล้วปรับปริมาตราให้เป็น 1 ลิตร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว กนกวรรณ ศรีงาม

วัน เดือน ปีเกิด 9 กรกฎาคม 2513

ประวัติการศึกษา

- ปีการศึกษา 2526-2528 มัธยมศึกษาปีที่ 1-3 โรงเรียนสาธิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.
- ปีการศึกษา 2529-2531 มัธยมศึกษาปีที่ 4-6 โรงเรียน ยุพราชวิทยาลัย จ.เชียงใหม่ .
- ปีการศึกษา 2536 ปริญญาตรี สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่.

ประวัติการทำงาน

- ตุลาคม 2535-มีนาคม 2538 สัตวบาลประจำฟาร์มปู่-ย่าพันธุ์ สุกร ฟาร์มลพบุรี บริษัทกรุงเทพผลิตผลอุตสาหกรรมการเกษตรจำกัด. (เครือเจริญโภคภัณฑ์).
- เมษายน 2538-พฤศจิกายน 2538 นักวิชาการอาหารสัตว์ บริษัทแอล.พี. ฟีดส์เทค จำกัด. จ.ลำพูน.
- ธันวาคม 2538-กันยายน 2540 ผู้ช่วยนักวิจัย โครงการวิจัยฯ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University