ภาคผนวก

ตารางที่ 2 จุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม

Restriction enzyme	Restriction site	อุณหภูมิในการบ่ม (องศาเซลเซียส)
Bfa I	C^TAG	37
Cla I	AT^CGAT	37
Hha I	GCG^C	37
Mbo I	^GATC	37
Mse I	T^TAA	37
Msp I	C^CGG	37
Rsa I	GT^AC	37
Taq I	T^CGA	65
Xmn I	GAANN^NNTTC*	37

* N = A, C, T หรือ G

1. Loading Buffer

   เตรียมครั้งละ 1 มิลลิลิตรของ

   Bromophenol blue-Xylene Cyanol Dry Solution : Formamide อัตรา 1 : 4 (Sigma, USA.)

2. 50x Tris acetate buffer (50x TAE electrophoresis buffer)

   Stock solution เตรียมครั้งละ 1000 มิลลิลิตร

Tris–base (Fisher, U.K.)	242 กรัม
glacial acetic acid	57.1 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0 (Sigma, USA.)	100 มิลลิลิตร

   ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 100 bp DNA Ladder (Biolabs, U.K.)

Stock solution เก็บไว้ที่ –20°C (1 มิลลิกรัมต่อ1 ไมโครลิตร)

Working solution เตรียมครั้งละ 1 มิลลิลิตร

100 bp DNA Ladder : Loading Buffer อัตรา 1 : 4

ผสมให้เข้ากัน สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 4°C ก็ได้ ใช้ครั้งละ 4 ไมโครลิตร ต่อ 1 well

4. Primer

Stock Primer ที่เป็น Lyophilize สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ปี เมื่อต้องการใช้ให้นำมาละลายใน TE buffer pH8.4 ปริมาตรสุดท้ายยิ่งน้อยยิ่งดี (ประมาณ 100-300 มิลลิลิตร) TE buffer ที่ใช้ต้องสะอาด (DNase and RNase-free) การละลาย Stock solution ให้ยึดตามโฉนดที่แนบมาในแต่ละ primer ซึ่งจะแสดงค่า OD เป็น mg/OD และ mmol/OD ซึ่งสามารถกำหนดความเข้มข้นของ Stock solution ได้ ความเข้มไม่จำเป็นต้องเท่ากันในทุก primer (เพราะอัตราในการสังเคราะห์ primer แต่ละตัวและแต่ละหลอดจะไม่เท่ากันโดยธรรมชาติ) บันทึกความเข้มข้นของ Stock solution และเก็บที่ –20°C จะมีอายุประมาณ 1-2 ปี

Working solution เตรียมครั้งละ 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นเท่ากัน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ mM) และเก็บไว้ที่ –20°

5. DNA Template

Stock DNA template ละลายใน TE buffer pH8.4 เก็บไว้ที่ –20 °C

Working DNA Template ปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากันที่ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใน TE buffer pH8.4 เก็บไว้ที่ –20°C ควรเตรียมครั้งละไม่เกิน 50 ไมโครลิตร

6. Acrylamide Solution

Stock solution (40%) เตรียมครั้งละ 100 มิลลิลิตร

Acrylamide	(Sigma, USA.)	38 กรัม
Bis – Acrylamide	(Sigma, USA.)	2 กรัม

ละลาย Acrylamide และ Bis-Acrylamide ในน้ำกลั่นปริมาตร 50-80 มิลลิลิตรก่อน อาจใช้ความร้อนช่วยในการละลาย แต่ระวังอย่าให้สารละลายร้อนเกินไป และควรใช้ magnetic stirrer (อย่าให้เกิดฟองอากาศ) เมื่อสารละลายหมดจึงค่อยเติมน้ำปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

Polyacrylamide gel ที่ใช้คือ 12% ใช้สารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อ แผ่น ประกอบด้วย

40% Acrylamide solution	1.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.5 มิลลิลิตร
10x TAE buffer	0.5 มิลลิลิตร
Ammonium persulfate	7.5 ไมโครลิตร
Temed	5.0 ไมโครลิตร

ละลายสารทั้งหมด ยกเว้น Temed ใน beaker ผสมให้เข้ากันดี ระวังอย่าให้เกิดฟองจากการเขย่าอย่างแรง เมื่อทำการ set กระจกที่จะเตรียม gel แล้ว จึงเติม Temed ลงในสารละลายข้างต้นแล้วเทลงใน plate ที่เตรียมไว้

ภายหลังการทำ electrophoresis gel จะถูกย้อมด้วย Ethedium bromide Staining solution ประมาณ 5 นาที ก่อนนำไปถ่ายรูป

7. 10% Ammonium persulfate

ชั่งสาร Ammonium persulfate 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C

8. Pipette tip

Pipette tip ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้แบ่งเป็น 3 แบบ คือ Tip สีฟ้า (500-1,000 ไมโครลิตร) เพื่อเตรียม buffer , Tip สีเหลือง (20-200 ไมโครลิตร) เพื่อเตรียม buffer, Tip สีขาว (2-10 ไมโครลิตร) เพื่อเตรียม PCR ใช้แล้วทิ้งหมด ส่วน Tip ที่เหลือ เพื่อการเตรียม PCR products ก่อน load, หรือกรณีอื่นที่ไม่ใช่ Pre-PCR สามารถนำมาล้างกลับมาใช้ใหม่ จนกว่าจะสังเกตได้ว่าไม่สะอาด อุดตัน หรือบิดงอเสียรูป วิธีการล้างคือการแช่ Tip ที่ใช้แล้วเหล่านั้นใน 10% (vol/vol) HCl ในน้ำกลั่น นานมากกว่า 1 สัปดาห์ แล้วนำมาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน และน้ำประปาหลายครั้งจนกว่าจะล้างฟองออกหมด สุดท้ายล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้งเพื่อล้างคราบน้ำประปาออก นำไปแผ่ให้แห้งในตู้อบที่ 40-50°C ต้องกลับกอง Tip เพื่อให้แห้งทั่วถึงกัน

9. Tris ethylenediaminetetra acetic acid buffer (TE buffer pH 8.0)

10mM Tris - HCl

1mM EDTA

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วนำไป autoclave

10. 1 M Tris – HCl pH 8.0

ชั่งสาร Tris base 121.1 กรัม ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้น จนได้ pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

11. 0.5 M EDTA

ชั่งสาร disodium ethylenediamine tetraacetate–$2H_2O$ 136.1 กรัม ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยการใช้ magnetic stirrer จากนั้นเติม NaOH เพื่อปรับให้ได้ pH 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA จะละลายได้หมดพอดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

12. 5 M NaCl

ชั่งสาร NaCl 29.2 กรัม ละลายน้ำโดยปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

13. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งสารละลายหมด ซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C ในการเตรียมสารนี้จะต้องระมัดระวังมาก โดยการใส่ถุงมือและอย่าหายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagent

14. 3 M Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate และละลายในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

15. SDS 10 % W / V

เตรียมครั้งละ 10 มิลลิลิตร ชั่ง SDS 1 กรัม เติมน้ำลงไปประมาณ 7 มิลลิลิตร คนให้ละลายพยายามอย่าให้เกิดฟอง จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

16. Proteinase K 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมครั้งละ 1 มิลลิลิตร โดยชั่ง Proteinase K 5 มิลลิกรัม ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายเก็บไว้ที่ -20°C

17. Rnase A 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมจาก stock ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดสาร 0.25 มิลลิลิตร หรือ 250 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ

กลั่น 99.75 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4°C เนื่องจากเมื่อเจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วอาจทำให้สารเสื่อมเร็วขึ้น

18. Lysis buffer

เตรียมครั้งละ 30 มิลลิลิตร โดยใช้สารต่าง ๆ ดังนี้

1 M Tris – HCl	1.5 มิลลิลิตร
0.5 EDTA	0.6 มิลลิลิตร
10 % SDS	1.5 มิลลิลิตร
Rnase A 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	120.0 ไมโครลิตร
Proteinase K 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	2.4 มิลลิลิตร

ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากันดีพยายามอย่าให้เกิดฟอง จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ –20 °C

19. Phenol–Chloform–isoamyl alcohol (25:24:1)

ใช้ Phenol–Chloform–isoamyl alcohol จากชุด Kit เมื่อต้องการใช้เติม buffer ที่แนบมาด้วยลงไป จากนั้นเขย่าแรง ๆ ทิ้งไว้ให้สารใส และเก็บไว้ในที่เย็น

20. Chloroform–isoamyl alcohol (24:1)

ใช้ Chloform–isoamyl alcohol จากชุด Kit สามารถใช้ได้ทันที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายกฤษณะ เรืองฤทธิ์
วัน เดือน ปี เกิด	23 สิงหาคม 2519
ประวัติการศึกษา	
- ระดับมัธยมต้น	โรงเรียนเมืองเชลียง
- ระดับมัธยมปลาย	โรงเรียนเมืองเชลียง
- ปริญญาตรี	ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University