ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1. การเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลายอื่นๆ

1.1. Acrylamide stock solution 30 % (100 ml)

1. acrylamide 30 g.
2. Bis - acrylamide 0.8 g.

ชั่งสาร 1 - 2 ใส่ในบีเกอร์ เติมน้ำลงไป ประมาณ 60 ml นำไปคนให้สารละลายผสมกันดีแล้วเติมน้ำให้ครบ 100 ml

1.2. Ammonium persulfate 15 % 10 ml

Ammonium persulfate 1.5 mg ใส่ในขวดที่มี foil หุ้มเติมน้ำ 10 ml ลงไปเขย่าให้สารละลาย (เตรียมก่อนใช้)

1.3 Chloroform - isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 :1)

ผสม Chloroform 240 ml และ isoamyl alcohol 10 ml ใส่ขวดสีชาหรือขวดที่มี foil หุ้ม นำไปเก็บไว้ที่ 4 ^{0} C

1.4 0.5 M EDTA

ชั่ง Dissodium ethylenediamine tetraacetate $\cdot 2H_2O$ 136.1 g นำไปละลายในน้ำ 800 ml คนด้วยการใช้ Magnetic stirrer หลังจากนั้นเติม NaOH ลงไปจนได้ pH 8.0ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA จะละลายได้หมดพอดี ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ml นำไป Autoclave

1.5 Ethidium bromide (10 mg/ml)

ชั่ง Ethidium bromide 1 g นำไปละลายในน้ำ 100 ml กวนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งสารละลายหมด (อาจใช้เวลาหลายชั่วโมง) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ขณะที่ชั่งสารจะต้องใส่ถุงมือและระวังอย่าหายใจเอาผง Ethidium bromide เข้าไป เพราะผงของสารค่อนข้างละเอียดและเบา สารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

1.6 Extraction buffer เพื่อสกัดเอนไซม์

1.	Tris HCl 0.2 M pH 8	100	ml
2.	EDTA 1 mM	29.2	mg
3.	DTT 2 mM	30.8	mg
4.	PVP - 40 0.5 %	500	mg
5.	H_2O		
6.	MSH 10 mM	80	µl

ผสมสาร 1 - 5 เข้าด้วยกัน นำไปคนให้ละลายผสมกันด้วย magnetic stirrerแล้วปรับ pH 8.0 สำหรับสาร 5 จะเติมหลังจากสารละลายผสมกันดีแล้ว เนื่องจากมีกลิ่นเหม็น

1.7 Extraction buffer สำหรับเตรียม DNA ตามวิธีของ Weissing *et. al.*

1.	CTAB	2	% (W/V)
2.	Tris HCl pH 8	100	mM
3.	EDTA	20	mM
4.	NaCl	1.4	M

5. H_2O

6. β - Mercaptoethanol 2 %

ผสมสาร 1 - 5 เข้าด้วยกัน เขย่าจนสารละลายผสมกัน ก่อนนำไปใช้ให้เติมสาร 6 ลงไปเนื่องจากมีกลิ่นเหม็นและระเหยได้

1.8 Extraction buffer สำหรับเตรียม DNA ตามวิธีการของ Doyle and Doyle

1. CTAB 4 % (W/V)
2. Tris HCl pH 8 100 mM
3. NaCl 1.4 M
4. EDTA 20 mM
5. PVPP 1 % (W/V)
6. H_2O
7. 2 - Mercaptoethanol 0.1 % (V/V)

ผสมสาร 1 - 6 เข้าด้วยกัน เขย่าจนสารละลายผสมกัน ก่อนนำไปใช้เติมสาร 7 ลงไปเนื่องจากสามารถระเหยได้ และมีกลิ่นเหม็น

1.9 Loading buffer

1. Bromophenol blue 0.25 %
2. Xylene cyanol 0.25 %
3. สารละลาย Sucrose 40 % (W/V)

ผสมสาร 1 - 3 เข้าด้วยกัน นำไปเก็บไว้ที่ $4^{0}C$

1.10 1 M $MgCl_2$

ชั่ง $MgCl_2 \circ 6H_2O$ 20.3 g นำไปละลายในน้ำกลั่น 80 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ทำให้ Sterile โดยการนำไป Autoclave

1.11 5 M NaCl

ชั่งสาร NaCl 29.2 g นำไปละลายในน้ำโดยปรับให้ได้ปริมาตร 100 ml นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.12 สารละลาย Phenol

1. Phenol	100 ml
2. 8 Hydroxy quinoline	400 mg
3. Tris HCl 1 M pH 8.0	200 ml
4. β - mercaptoethanol	200 μl

นำ Phenol มาหลอมให้ละลายบน Hot plate ที่อุณหภูมิ 65 ^{0} C เติม Hydroxy quinoline (ซึ่งเป็นสาร Antioxidant) 1 M Tris HCl pH 8.0 นำไปคนด้วย magnetic stirrer นาน 5 ชม. ปล่อยให้แยกชั้นดูด Aqueous phase ชั้นบนออก สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วย 1M Tris HCl pH 8.0 จนกระทั่ง pH ของ Phenol $>$ 7.8 (ทดสอบด้วย pH paper) เติม β - mercaptoethanol และ 1 M tris HCl pH 8.0 100 ml เพื่อปิดผิวของสารละลาย เก็บสารละลายฟีนอลอิ่มตัวที่ได้ในขวดสีเข้ม ที่อุณหภูมิ 4 ^{0} C

1.13 Runing buffer สำหรับไอโซไซม์ (1000 ml)

1. Tris HCl 0.025 M 3 g
2. Glycine 0.192 M 14.4 g

ชั่งสาร 1 - 2 ใส่บีเกอร์ เติมน้ำลงไปประมาณ 500 ml. เมื่อสารละลายหมดแล้วจึงเติมน้ำลงไปให้ได้ปริมาตร 1000 ml ปรับให้ได้ pH 8.3 ด้วย HCl

1.14 20 % SDS

ชั่งสาร SDS จำนวน 20 g ละลายในน้ำกลั่นที่ Sterile แล้ว 100 ml อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อให้สารละลายได้ดีขึ้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.15 การเตรียม TAE 50 X (1000 ml)

1. Tris base 242 g.
2. glacial acetic acid 57.1 ml.
3. EDTA 0.5 M pH 8 100 ml

ผสมสาร 1 - 3 เข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1000 ml. นำไปทำให้ Sterile โดย Autoclave เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

1.16 TE buffer

1. 10 mM Tris HCl pH 8.0
2. 1 mM EDTA

ผสมสาร 1- 2 แล้วนำไปทำให้ Sterile โดยนำไป Autoclave

1.17 1 M Tris HCl

ชั่ง Tris base 121.1 g ละลายในน้ำ 800 ml ปรับ pH โดยการใช้กรด HCl เข้มข้นจนได้ pH ที่ต้องการ (pH 6.8 - 8) แล้วปรับให้ได้ปริมาตร 1000 ml ทำให้ Sterile โดยนำไป Autoclave

2. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

2.1 การย้อม Aspartate amino transferase (AAT or GOT) E.C. 2.6.1.1 ประกอบด้วย

1. Tris HCl 0.1 M	25	ml
2. α - ketoglutaric acid	30	mg
3. aspatic acid	50	mg
4. Piridoxal 5 P 10 %	10	μl
5. Fast Blue BB	50	mg

ผสมสาร 1 - 3 คนให้ละลายผสมกัน นำไปปรับให้ได้ pH 7.4 เมื่อจะย้อมไอโซไซม์ให้ผสมสาร 4 - 5 ลงไป จึงย้อมเจลในที่มืดจนกว่าจะเกิดแถบของไอโซไซม์

2.2 การย้อมไอโซไซม์ Esterase (EST) E.C.3.1.1.2 ประกอบด้วย

1. Tris HCl 0.1 M pH 7.0	25	ml
2. α - napthyl acetate	10	mg
3. β - napthyl acetate	5	mg
4. O - Dianisidine salt	30	mg

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

นำสาร 2 แล ะ 3 ผสมเข้าด้วยกันแล้วทำละลายด้วย acetone แล้วจึงผสมลงในสาร 1 พร้อมกับ สาร 4 แล้วย้อมทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 15 - 30 นาที

2.3 การย้อม Leucine amino peptidase (LAP) ประกอบด้วย

1. Sodium phosphate 0.1 M pH 6	25	ml
2. L - Leucine β - naphthyl acid	100	µl
3. $MgCl_2$ 1 M	500	µl
4. O - Diasidine	20	mg

ผสมสาร 1 และ 3 เข้าด้วยกัน เมื่อถึงเวลาย้อมจึงใส่สาร 2 และ 4 ลงไปก่อนย้อม นำไปเก็บไว้ในที่มืดจนกระทั่งเกิดแถบของไอโซไซม์ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 - 60 นาที

2.4 การย้อม Malate dehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37 ประกอบด้วย

1. Tris HCl 0.1 M pH 7.5	25	ml
2. L - malic acid	25	mg
3. NAD 10 % in water	100	µl
4. NBT 10 % in methanol	50	µl
5. PMS 10 %	10	µl

นำสาร 2 ใส่ลงในสาร 1 แล้วปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย HCl ก่อนที่จะนำสาร 3 , 4 และ 5 ผสมลงไปตามลำดับ แล้วนำเจลไปย้อมในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 37 ^{0}C ทิ้งไว้ประมาณ 15 - 30 นาที

2.5 การย้อม Peroxidase (POX) E.C.1.11.1.7 ประกอบด้วย

1. Na - acetate 0.05 M pH 5.0 25 ml
2. CaCl2 1.0 M 0.5 ml
3. Sol B 2.5 ml
4. Sol C 1.0 ml

Sol B			Sol C		
1. Eugenol	200	µl	1. water	18	ml
2. 3A9EC	10	mg	2. H_2O_2	750	µl
3. acetone	10	ml	3. acetic acid	250	µl

ผสมสาร 1และ 2 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนย้อมจึงใส่สาร 3 และ 4 ลงไป แล้วนำไปย้อมเจลโดยทิ้งไว้ในที่มีแสงประมาณ 30 - 60 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 ^{0} C

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

3. Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดง Primers และbase sequence ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

Primer	Sequence
OPA 03	5' AGTCAGCCAC 3'
OPA 05	5, AGGGGTCTTG 3'
OPA 15	5' TTCCGAACCC 3'
OPA 16	5' AGCCAGCGAA 3'
OPA 17	5' GACCGCTTGT 3'
OPA 19	5' GACCGCTTGT 3'
OPA 20	5' CAAACGTCGG 3'
OPAA 07	5' GTTGCGATCC 3'
OPAA 13	5' CTACCCTCAC 3'
OPAA 16	5' GAGCGTCGCT 3'
OPAA 20	5' GGAACCCACA 3'
OPAB 04	5' TTGCCTTCGG 3'
OPAC 14	5' GGCACGCGTT 3'
OPAC 20	5' GTCGGTTGTC 3'
OPAH 17	5' ACGGAAGTGG 3'
OPAJ 04	5' CAGTGGGGAG 3'
OPAK 18	5' GAATGCGACC 3'
OPAM 10	5' ACCCGGAAAC 3'
OPAQ 05	5' GAGACCGACC 3'
OPE 15	5' ACGGAGCTGA 3'

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

Primer	Sequence
OPE 20	5' ACGCACAACC 3'
OPK 04	5' CCGCCCAAAC 3'
OPK 10	5' GTGCAACGTG 3'
OPK 11	5' AATGCCCCAG 3'
OPK 13	5' GGTTGTACCC 3'
OPK 14	5' CCCGCTACAC 3'
OPK 18	5' CCTAGTCGAG 3'
OPW 14	5' CTGCTGAGCA 3'
OP 680	5' GTCTCCGCAA 3'
OP 682	5' GATGACCACC 3'

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวนวลน้อย แจ่มจันทา

วัน เดือน ปีเกิด 11 สิงหาคม 2506

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล เมื่อปีการศึกษา 2531

ประสบการณ์การทำงาน 2531 - ปัจจุบัน อาจารย์ 1 ระดับ 4 โรงเรียนเทิงวิทยาคม อ.เทิง จ.เชียงราย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University