ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

1) การเตรียม Essential medium

MEM	9.50	g
$NaHCO_3$	0.80	g
Penicillin/Streptomycin (10,000 unit/ml)/(10 mg/ml)	1,000	µl
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1,000	ml

ชั่ง MEM มา 9.50 g ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1,000 ml เติม $NaHCO_3$ หนัก 0.80 g ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 micron จากนั้นเติม Penicillin/Streptomycin ปริมาตร 1,000 µl เทใส่ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว และจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ˚C

2) การเตรียม Inactivated serum

ซีรัมที่เลือกใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 3 ชนิด คือ

- Iron supplemented calf serum
- Bovine calf serum
- Fetal bovine serum

ก่อนนำไปใช้ให้นำขวดซีรัมไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 ˚C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์คอมพลีเมนต์ (complement cell) ในซีรัม ส่วนที่เหลือหลังใช้งานสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ˚C

3) การเตรียม Growth medium

ปิเปต Inactivated serum ปริมาตร 10 ml ใส่ในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย Essential medium แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4) การเตรียม Maintenance medium

ปิเปต Inactivated serum ปริมาตร 2 ml ใส่ในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย Essential medium แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C

5) การเตรียม 10% (w/v) $NaHCO_3$

ชั่ง $NaHCO_3$ มา 10.00 g แล้วละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121˚C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C

6) การเตรียม 1.5% (w/v) Sodium carboxy methylcellulose

ชั่ง Sodium carboxy methylcellulose มา 1.50 g แล้วละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121˚C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C

7) การเตรียม Overlay medium

1.5% (w/v) Sodium carboxy methylcellulose	3.5	ml
Growth medium	10.5	ml
10% (w/v) $NaHCO_3$	50	µl

เตรียมสารละลายตามปริมาตรที่กำหนด ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C

8) การเตรียม 10X Phosphate Buffer Saline (10X PBS)

NaCl	40.00	g
KCl	1.00	g
Na_2HPO_4	5.75	g
KH_2PO_4	1.00	g

ชั่ง NaCl KCl Na_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ตามน้ำหนักที่กำหนด แล้วละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121˚C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C (ก่อนนำไปใช้ให้เจือจางสารละลายลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9) การเตรียม 0.05% (w/v) Trypsin-EDTA

ปิเปต 0.5% (w/v) Trypsin-EDTA ปริมาตร 10 ml ใส่ในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย 1X PBS แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

10) การเตรียม 0.1% (w/v) Crystal violet ใน Ethanol

Crystal violet	0.50	g
95% (v/v) Ethanol	5	ml

ชั่ง Crystal violet มา 0.50 g แล้วละลายใน 95% (v/v) Ethanol ปริมาตร 5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

1) การเตรียมสารละลาย Bromophenol blue stock

ชั่ง Bromophenol blue มา 0.010 g และ Tris base 0.006 g ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml เติมน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดละ 500 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C

2) การเตรียม 10% (w/v) SDS

ชั่ง SDS มา 10.0 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 100 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3) การเตรียม 10% (w/v) Ammonium persulfate

ชั่ง Ammonium persulfate มา 0.050 g ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml เติมน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C (ควรเตรียมก่อนใช้งาน)

4) การเตรียม 0.5 M Dithiothreitol (DTT)

ชั่ง DTT มา 0.039 g ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml เติมน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดละ 50 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

5) การเตรียม 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

ชั่ง Tris base มา 6.06 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 80 ml แล้วจึงปรับพีเอชของสารละลายเป็น 6.8 ด้วยสารละลาย 6 M HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำ ปราศจากไอออน จนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6) การเตรียม 1 M Tris-HCl pH 6.8

ชั่ง Tris base มา 12.11 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ml แล้วจึงปรับพีเอชของสารละลายเป็น 6.8 ด้วยสารละลาย 6 M HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

7) การเตรียม 1 M Tris-HCl pH 7.5

ชั่ง Tris base มา 6.06 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 30 ml แล้วจึงปรับพีเอชของสารละลายเป็น 7.5 ด้วยสารละลาย 6 M HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 50 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

8) การเตรียม 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

ชั่ง Tris base มา 18.17 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ml แล้วจึงปรับพีเอชของสารละลายเป็น 8.8 ด้วยสารละลาย 6 M HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

9) การเตรียม 0.2 M EDTA pH 8.0

ชั่ง EDTA มา 2.92 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 30 ml แล้วจึงปรับพีเอชของสารละลายเป็น 8.0 ด้วยสารละลาย NaOH จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 50 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10) การเตรียม 0.15 M NaCl

ชั่ง NaCl มา 0.438 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ml เทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11) การเตรียม 1 M NaCl

ชั่ง NaCl มา 0.292 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 5 ml เทใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

12) การเตรียม 1 M $MgCl_2$

ชั่ง $MgCl_2$ มา 0.476 g ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 5 ml เทใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

13) การเตรียม 0.057 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

ชั่ง PMSF มา 0.010 g ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

14) การเตรียมสารละลาย 100X Cocktail protease inhibitor

ปิเปตสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 ml ใส่ในขวด vial ของ Cocktail protease inhibitor set III ที่อยู่ในรูปผงระเหยแห้ง ผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส ดังตาราง ผ.1 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

ตารางที่ ผ.1 องค์ประกอบของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสในสารละลาย 100X Cocktail protease inhibitor

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถยับยั้ง
AEBSF, Hydrochloride	100 mM	Serine Proteases
Aprotinin	80 µM	Broad Spectrum, Serine Proteases
Bestatin	5 mM	Aminopeptidase B and Leucine Aminopeptidase
E-64 Protease Inhibitor	1.5 mM	Cysteine Proteases
Leupeptin Hemisulfate	2 mM	Cysteine Proteases and Trypsin-like Proteases
Pepstatin A	1 mM	Aspartic Proteases

15) การเตรียมสารละลาย 3X Sample

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	3	ml
0.2 M EDTA pH 8.0	300	µl
10% (w/v) SDS	3	ml
β-mercaptoethanol	300	µl
87% (w/v) Glycerol	2.4	ml
Bromophenol blue stock solution	100	µl

เตรียมสารละลายต่างๆ ตามปริมาตรที่กำหนด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนครบ 10 ml ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนเทใส่ขวดแก้ว แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16) การเตรียม Bradford reagent

Coomassie Brilliant Blue G-250	0.020	g
95% (v/v) Ethanol	10.5	ml
85% (w/v) Phosphoric acid	20	ml

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 มา 0.020 g ละลายใน 95% (v/v) Ethanol และ 85% (w/v) Phosphoric acid ตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 ml ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นเทใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

17) การเตรียมสารละลาย 10X SDS electrophoresis

Tris base	30.37	g
Glycine	144.13	g
SDS	10.00	g

ชั่ง Tris base Glycine และ SDS ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 ml ตามน้ำหนักที่กำหนด ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 500 ml ผสมให้เข้ากันก่อนปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1,000 ml เทใส่ขวดแก้วแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (หากนำไปใช้ให้เจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำปราศจากไอออน)

18) การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Protein marker

DTT	0.015	g
1 M Tris-HCl pH 6.8	62.5	µl
10% (w/v) SDS	200	µl
87% (w/v) Glycerol	115	µl
Bromophenol blue stock solution	10	µl

ชั่ง DTT มา 0.015 g ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml เติมสารละลายต่างๆ ตามปริมาตรที่กำหนด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนครบ 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

19) การเตรียม Low molecular weight (LMW) protein marker

ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ Protein marker ปริมาตร 200 µl ใส่ในขวด vial ของ protein marker (LMW calibration kit) ที่อยู่ในรูปโปรตีนผงระเหยแห้ง ผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

20) การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ CHAPS-Urea-Thiourea

Urea	4.20	g
Thiourea	1.52	g
CHAPS	0.400	g
DTT	0.062	g
87% (w/v) Glycerol	575	µl
Isopropanol	1	ml

ชั่ง Urea Thiourea CHAPS และ DTT ตามน้ำหนักที่กำหนดลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml แล้วละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 3 ml จากนั้นเติม 87% (w/v) Glycerol และ Isopropanol ตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 ml ผสมให้เข้ากันก่อนแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

21) การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40

1 M Tris-HCl pH 7.5	100	µl
1 M NaCl	100	µl
1 M MgCl	30	µl
10% (w/v) NP-40	0.5	ml

ปิเปตสารละลายต่างๆ ตามปริมาตรที่กำหนดลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนครบ 10 ml ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

22) การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ NP-40-Urea-Thiourea

Urea	4.20	g
Thiourea	1.52	g
1 M Tris-HCl pH 7.5	100	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 M NaCl	100	µl
1 M MgCl	30	µl
10% (w/v) NP-40	0.5	ml

ชั่ง Urea และ Thiourea ตามน้ำหนักที่กำหนดลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml แล้วละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 3 ml จากนั้นเติมสารละลายอื่นๆ ตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 ml ผสมให้เข้ากันก่อนแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

23) การเตรียมสารละลาย Rehydration

Urea	4.20	g
Thiourea	1.52	g
CHAPS	0.400	g
DTT	0.062	g
87% (w/v) Glycerol	575	µl
Isopropanol	1	ml
Bromophenol blue stock solution	20	µl

ชั่ง Urea Thiourea CHAPS และ DTT ตามน้ำหนักที่กำหนดลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml แล้วละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 3 ml จากนั้นเติม 87% (w/v) Glycerol Isopropanol และสารละลาย Bromophenol blue stock ตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 10 ml ผสมให้เข้ากันก่อนแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

24) การเตรียมสารละลาย SDS equilibrium

Urea (MW 60.06)	36.04	g
SDS	2.00	g
Tris base	4.54	g
87% (w/v) Glycerol	23	ml
Bromophenol blue stock solution	200	µl

ชั่ง Urea SDS และ Tris base ตามน้ำหนักที่กำหนดลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml ปิเปต 87% (w/v) Glycerol และสารละลาย Bromophenol blue stock ตามปริมาตรที่กำหนด เติมน้ำปราศจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 30 ml ผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียว แล้วจึงปรับพีเอชของสารละลายเป็น 8.8 ด้วยสารละลาย 6 M HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 100 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C

25) การเตรียมสารละลาย 12.5% (w/v) acrylamide

40% (w/v) AccuGel	12.52	ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	10	ml
Deionized water	16.87	ml
10% (w/v) SDS	400	µl
10% (w/v) Ammonium persulfate	200	µl
TEMED	20	µl

ปิเปตสารละลายต่างๆ ตามปริมาตรที่กำหนดลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml โดยเติมสารละลาย 10% (w/v) Ammonium persulfate และ TEMED ลงไปเป็นลำดับสุดท้าย ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงในอุปกรณ์หล่อเจลที่ประกอบไว้ (ควรเตรียมก่อนใช้งาน)

26) การเตรียมสารละลาย 5% (w/v) acrylamide

40% (w/v) AccuGel	1	ml
1 M Tris-HCl pH 6.8	1	ml
Deionized water	5.83	ml
10% (w/v) SDS	120	µl
10% (w/v) Ammonium persulfate	50	µl
TEMED	5	µl

ปิเปตสารละลายต่างๆ ตามปริมาตรที่กำหนดลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml โดยเติมสารละลาย 10% (w/v) Ammonium persulfate และ TEMED ลงไปเป็นลำดับสุดท้าย ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงในอุปกรณ์หล่อเจลที่ประกอบไว้ (ควรเตรียมก่อนใช้งาน)

27) การเตรียมสารละลาย 0.5% (w/v) Agarose

ชั่ง Agarose มา 0.100 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 ml แล้วละลายด้วย 1X SDS running buffer ปริมาตร 20 ml จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 ˚C จน Agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลาย แล้วจึงเติมสารละลาย Bromophenol blue stock ปริมาตร 40 µl ผสมให้เข้ากันก่อนแบ่งใส่ขวดใสขวดละ 5 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

28) การเตรียมสารละลาย Fixation

95% (v/v) Ethanol	210.5	ml
Glacial acetic acid	50	ml

เตรียม 95% (v/v) Ethanol และ Glacial acetic acid ตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

29) การเตรียมสารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) stock

Coomassie Brilliant Blue G-250	1.00	g
Ammonium sulfate	100.00	g
85% (w/v) phosphoric acid	12	ml

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 และ Ammonium sulfate ตามน้ำหนักที่กำหนดลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 ml เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 400 ml ผสมจนของแข็งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม 85% (w/v) Phosphoric acid ปริมาตร 12 ml จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1,000 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดแก้ว แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

30) การเตรียมสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG)

CBBG stock solution	400	ml
Methanol	100	ml

ผสมสารละลาย CBBG stock ปริมาตร 400 ml เข้ากับ Methanol ปริมาตร 100 ml ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 ml ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำไปใช้

31) การเตรียมสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250

Coomassie Brilliant Blue R-250	1.00	g
Methanol	500	ml
Glacial acetic acid	100	ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue R-250 มา 1.00 g ละลายใน Methanol และ Glacial acetic acid ตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

32) การเตรียมสารละลายชะสีย้อม (Destain solution)

Methanol	100	ml
Glacial acetic acid	100	ml

ผสม Methanol และ Glacial acetic acid เข้าด้วยกันตามปริมาตรที่กำหนด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml ผสมให้เข้ากันก่อนเทใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

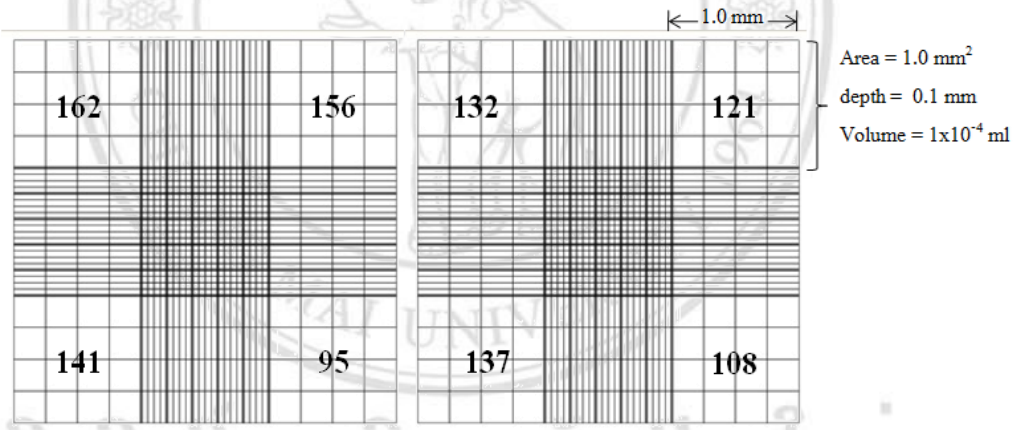
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาจำนวนเซลล์และปริมาณไวรัส

ค.1 การคำนวณหาจำนวนเซลล์ด้วย Hemacytometer

เมื่อต้องการนับจำนวนเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2 เริ่มจากแยกเซลล์ออกจากภาชนะด้วยการย่อยด้วยทริปซิน จากนั้นละลายเซลล์ที่หลุดออกจากภาชนะด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 3 ml นำสารละลายตัวอย่างเซลล์ดังกล่าวไปเจือจาง 2 เท่าก่อนนำไปนับปริมาณเซลล์ด้วย hemacytometer ได้ผลการนับจำนวนเซลล์ดังรูปที่ ผ.1 จากผลการทดลองสามารถคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ดังนี้



รูปที่ ผ.1 ตัวอย่างผลการทดลองนับจำนวน Vero cell บน hemacytometer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการคำนวณ

จากผลการทดลองผลรวมจำนวน Vero cell = 162+156+141+95+132+121+137+108

= 1,052 cells

คิดเป็นค่าเฉลี่ย = $\frac{1,052}{8}$ cells

= 132 cells

ถ้าปริมาตร 0.1 mm^3 มีจำนวนเซลล์ = 132 cells

ดังนั้นใน 1000 mm^3 (1 ml) มีจำนวนเซลล์ = $\frac{132 \times 1000}{0.1}$ cells/ml

= 132×10^4 cells/ml

สารละลายตัวอย่างเซลล์มีการเจือจางก่อนทำการนับเซลล์ 2 เท่า ดังนั้นให้พิจารณาค่าการเจือจาง มาคูณกลับเพื่อคิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์

ดังนั้น Vero cell จะมีความเข้มสุดท้าย = $(132 \times 10^4) \times 2$ cells/ml

= 264×10^4 cells/ml

คำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์โดยพิจารณาจากปริมาตรของอาหารเลี้ยงทั้งหมดที่ใช้ละลายเซลล์ทั้งหมดออกจากภาชนะ โดยในการทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 ml

ถ้าปริมาตร 1 ml มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด = 264×10^4 cells

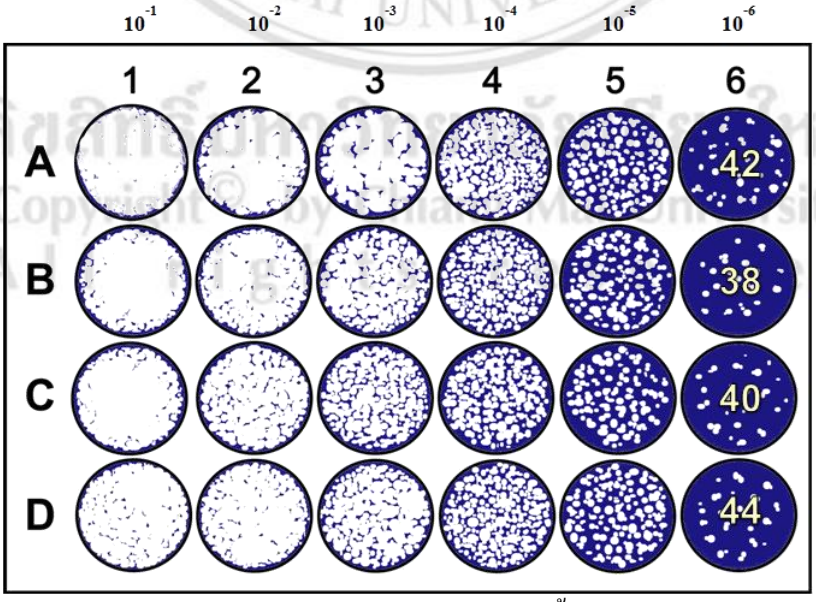
ดังนั้นในปริมาตร 3 ml มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด = 792×10^4 cells

= 7.9×10^6 cells

สรุปได้ว่าในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 75 cm^2 มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด 7.9×10^6 cells

ค.2 การคำนวณหาปริมาณไวรัสโดยการนับจำนวนการเกิดพลาค

จานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้นับจำนวนพลาคมีทั้งหมด 24 หลุมแบ่งออกเป็น 4 แถว และ 6 คอลัมน์ (ดังรูปที่ ผ.2) โดยคอลัมน์ 1 ถึง 6 คือ เซลล์เพาะเลี้ยงที่เติมไวรัสเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} เท่า และแถว A B C และ D ใช้สำหรับการทดลองซ้ำ การนับจำนวนพลาคให้เลือกนับหลุมที่มีพลาคชัดเจน ที่มีพลาคอยู่ระหว่าง 10-100 พลาค



รูปที่ ผ.2 ตัวอย่างผลการทดลอง plaque titration assay ของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 24 หลุมโดยทดลองซ้ำทั้งหมด 4 ซ้ำ

สำหรับการหาปริมาณไวรัสมีขั้นตอนการคำนวณดังนี้

กำหนดให้จำนวนพลาคที่ปรากฏบนหลุม	=	Y	พลาค
โดย 1 พลาคคิดเป็น 1 PFU จึงมีปริมาณไวรัส	=	Y	PFU
เมื่อพิจารณาค่าการเจือจางไวรัส (10^{-Z} เท่า)	=	$Y\times10^{Z}$	PFU
จากปริมาตรไวรัสที่ใช้ 100 µl ต่อหลุม จึงมีปริมาณไวรัส	=	$Y\times10^{Z}$	PFU/100 µl
ดังนั้นปริมาณไวรัสจึงมีค่าเท่ากับ	=	$\frac{Y\times10^{Z}}{10^{-1}}$	PFU/ml

ตัวอย่างการคำนวณ

หากต้องการหาปริมาณไวรัสจากตัวอย่างไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 เพื่อใช้สำหรับในการเพาะเลี้ยงบนเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell เมื่อนำตัวอย่างไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ทำการทดลอง plaque titration assay สามารถนับจำนวนพลาคในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เติมไวรัสเจือจาง 10^{-6} เท่าได้เท่ากับ 42 38 40 และ 44 พลาค ซึ่งทดลองซ้ำ 4 ครั้ง ดังแสดงในรูปที่ ผ.2 จากการทดลองสามารถหาปริมาณไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในหน่วย PFU/ml ได้ดังนี้

วิธีการคำนวณ

จากผลการทดลองจะได้ผลรวมจำนวนพลาคโดยเฉลี่ย	=	$\frac{42+38+40+44}{4}$	พลาค
	=	41	PFU
เมื่อพิจารณาค่าการเจือจางไวรัส (10^{-6} เท่า) จะมีปริมาณไวรัส	=	41×10^{6}	PFU
จากปริมาตรไวรัสที่ใช้ 100 µl ต่อหลุม จึงมีปริมาณไวรัส	=	41×10^{6}	PFU/100 µl

ดังนั้นในตัวอย่างไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 มีปริมาณอนุภาคไวรัส 41×10^{7} PFU/ml

ค.3 การคำนวณปริมาตรไวรัส

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสบนเซลล์เจ้าบ้านจะมีการกำหนดค่าอัตราส่วนของจำนวนเซลล์เจ้าบ้านต่ออนุภาคไวรัสให้คงที่ ซึ่งเรียกค่านี้เรียกว่า multiplicity of infection (MOI) มีหน่วยเป็น PFU/cell ดังนั้นปริมาตรของไวรัสในแต่ละการทดลองจะไม่คงที่แต่แปรผันตามความเข้มข้นของไวรัส (PFU/ml) และจำนวนของเซลล์เจ้าบ้าน (cell) โดยมีสมการการคำนวณดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาตรของไวรัส (ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ (cell)} \times \text{MOI (PFU/cell)}}{\text{ความเข้มข้นของไวรัส (PFU/ml)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยกตัวอย่างการคำนวณ

หากต้องการเติมตัวอย่างไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 จาก stock ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ในหน่วย MOI เท่ากับ 5 PFU/cell โดยก่อนทดลองได้วัดจำนวนเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงของกลุ่มเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell และปริมาณอนุภาคไวรัสใน stock ได้ค่าเท่ากับ 4×10^{6} cells และ 4×10^{7} PFU/ml ตามลำดับ ดังนั้นสามารถคำนวณปริมาตรไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ที่ต้องเติมลงไปได้ดังนี้

วิธีการคำนวณ

แทนตัวค่าจำนวนเซลล์เจ้าบ้านและปริมาณไวรัสลงในสมการดังนี้

$$\text{ปริมาตรของไวรัส} = \frac{4\times10^{6}\ (\text{cells})\times 5\ (\text{PFU/cell})}{4\times10^{8}\ (\text{PFU/ml})}$$

$$= \frac{20\times10^{6}\ \text{PFU}}{4\times10^{8}\ (\text{PFU/ml})}$$

$$= 5\times10^{-2}\ \text{ml}$$

$$= 500\ \mu\text{l}$$

ดังนั้นค่า MOI เท่ากับ 5 PFU/cell ต้องเติมตัวอย่างไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน Vero cell ปริมาตร 500 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างโปรตีน

ง.1 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

จากการหาความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีนด้วยวิธี Bradford ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และสารละลายตัวอย่างโปรตีนที่ 595 nm (A_{595}) ดังแสดงในตารางที่ ผ.1

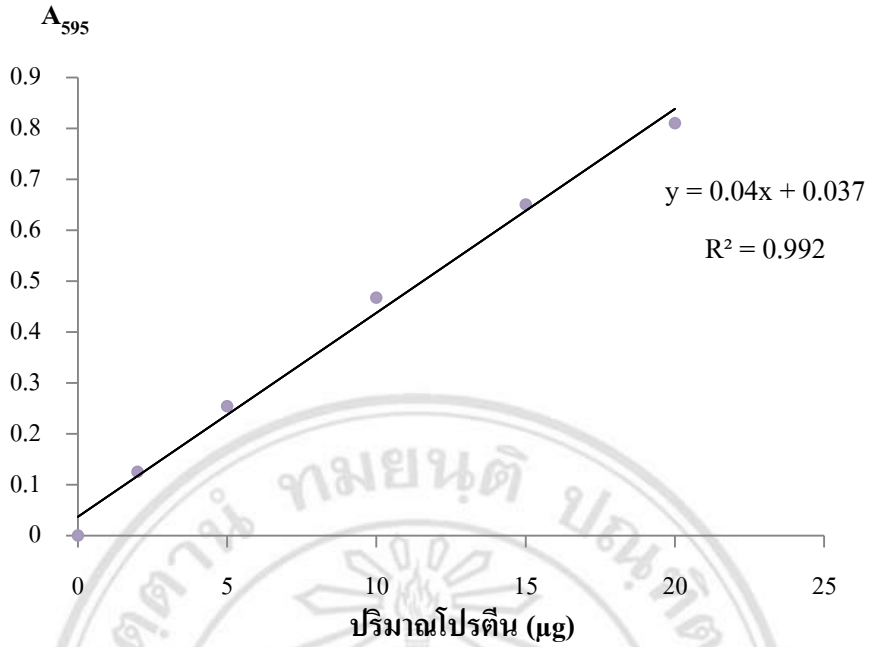
ตารางที่ ผ.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และปริมาณโปรตีนมาตรฐาน BSA

ปริมาณโปรตีน BSA (µg)	A_{595}			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย ± SD
0	0.000	0.000	0.000	0.000 ± 0.000
2	0.132	0.122	0.122	0.125 ± 0.006
5	0.251	0.240	0.272	0.254 ± 0.016
10	0.472	0.461	0.461	0.467 ± 0.006
15	0.640	0.654	0.656	0.650 ± 0.009
20	0.801	0.803	0.825	0.810 ± 0.013
สารละลายตัวอย่างโปรตีน				
M1 LOT3	0.351	0.341	0.349	0.347 ± 0.007
H1 LOT3	0.412	0.422	0.426	0.420 ±0.005

หมายเหตุ M1 LOT3 คือ สารละลายโปรตีนที่สกัดได้จาก Vero cell (กลุ่มควบคุม)
H1 LOT3 คือ สารละลายโปรตีนที่สกัดได้จาก Vero cell ที่ติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 (กลุ่มทดลอง)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และปริมาณโปรตีน BSA มาสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนได้ดังรูปที่ ผ.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ ผ.3 กราฟมาตรฐานโปรตีนที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

ง.2 การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างโปรตีน

จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานโปรตีนคือ $y = 0.04x + 0.037$

<u>กำหนดให้</u> x คือ ปริมาณโปรตีน (µg)

y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm (A_{595})

สารละลาย M1 LOT3 ปริมาตร 4 µl วัด A_{595} ได้เฉลี่ยเท่ากับ 0.347

สารละลาย H1 LOT3 ปริมาตร 4 µl วัด A_{595} ได้เฉลี่ยเท่ากับ 0.420

เมื่อแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานจะได้ว่า

สารละลาย M1 LOT3 มีความเข้มข้นของโปรตีน = 7.75 µg/4 µl

= 1.94 µg/µl

สารละลาย M1 LOT3 มีความเข้มข้นของโปรตีน = 9.58 µg/4 µl

= 2.39 µg/µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ง.3 การคำนวณปริมาตรของสารละลายตัวอย่างโปรตีนสำหรับทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง

การทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่งโดยใช้ IPG strip pH 3-10 NL ขนาด 13 cm และใช้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 200 µg สามารถคำนวณปริมาตรของสารละลายตัวอย่างโปรตีนได้ดังนี้

สารละลาย M1 LOT3 มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1.94 µg/µl

ปริมาณโปรตีน	1.94	µg	ในสารละลายปริมาตร	1	µl
หากต้องการโปรตีน	200	µg	จะต้องใช้สารละลายโปรตีนปริมาตร	103.09	µl

สารละลาย H1 LOT3 มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 2.39 µg/µl

ปริมาณโปรตีน	2.39	µg	ในสารละลายปริมาตร	1	µl
หากต้องการโปรตีน	200	µg	จะต้องใช้สารละลายโปรตีนปริมาตร	83.68	µl

IPG strip holder ขนาด 13 cm ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่างโปรตีนสำหรับทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง กำหนดให้ปริมาตรของสารละลายรวมเท่ากับ 250 µl ซึ่งมีองค์ประกอบของสารเคมีต่างๆ ในปริมาตรและความเข้มข้นดังแสดงในตารางที่ ผ.2

ตารางที่ ผ.3 ปริมาตรขององค์ประกอบต่างๆ ในสารละลายสำหรับทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิ่ง

สารละลาย	**ปริมาณโปรตีนและความเข้มข้นสุดท้าย**	**ปริมาตรของสารละลาย (µl)**	
		M1 LOT3	**H1 LOT3**
สารละลายตัวอย่างโปรตีน	200 µg	103.09	83.68
Rehydration buffer	-	135.66	155.07
0.5 M DTT	20 mM	10	10
100% IPG buffer pH 3-10 NL	0.5% (v/v)	1.25	1.25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นาย อนุชา ตระกูลชนะ	
วัน เดือน ปี เกิด	19 สิงหาคม พ.ศ. 2530	
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2544	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนวชิรวิทย์ศึกษา จังหวัดเชียงใหม่
	ปีการศึกษา 2547	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวชิรวิทย์ศึกษา จังหวัดเชียงใหม่
	ปีการศึกษา 2552	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผลงานวิจัย	ปีการศึกษา 2551	งานวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต ในหัวข้อ การสังเคราะห์สารประกอบเอสเทอร์ด้วยไลเปสจากตับอ่อนหมู ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2551
การเสนอผลงาน	3-5 ตุลาคม 2555	ในหัวข้อ : A comparison of protein extraction buffers appropriate for proteomic studies of HSV-2 infected cell proteins. ชื่อการประชุม: The 11th International Conference on Bioinformatics (InCoB2012)
	6-8 สิงหาคม 2557	ในหัวข้อ : Optimization of protein extraction from herpes simplex virus-type 2 infected cell for proteomic analysis. ชื่องานประชุม: 7th AOHUPO Congress and 9th International Symposium of the Protein Society of Thailand

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved