รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษม พงษ์มณี. 2536. การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ตลนภา ตนุนาถ. 2538. การโคลนยีนโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปกรณ์ วิโรจน์กุลกิจ. 2532. การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริพร สิทธิประณีต. 2532. พันธุวิศวกรรมปฏิบัติการเบื้องต้น. หน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์. 2534. การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาต่างประเทศ

Ausubel, F.M., et al. 1989. Enzymatic Manipulation of DNA and RNA. Current Protocols in Molecular Biology. Chapter 3. New York: Green Publishing Associates and Wiley Intersciences.

Bedoouelle, H. and Duplay, P. 1988. Production in *Escherichia coli* and One-step Purification of Bifunctional Hybrid Proteins which Bind Maltose. European Journal Biochemistry 171: 541-549.

Chang, J.Y. 1985. Thrombin specificity Requirement for Apolar Amino Acids Adjacent to the Thrombin Cleavage Site of Polypeptide Substrate. European Journal Biochemistry 151: 217-224.

Chittenden, T., Livingston, D.M. and Kaelin, Jr., W. G. 1991. The T/E1A-Binding Domain of the Retinoblastioma Product Can Interact Selectively with a Sequence-specific DNA-Binding Protein. Cell 65: 1073.

Coleman, G. 1967. Studies on The Regulation of Extracellular Enzyme Formation by *Bacillus subtilis*. Journal of Genetic Microbiology 49: 421-431.

Dancer, B.N. and Mandelstem, J. 1975. Production and Possible Function of Serine Protease During Sporulation of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 121: 406-410.

De Boer, H.A., Comstock, L.J. and Vasser, M. 1983. The *tac* Promoter: a Functional Hybrid Derived from The *trp* Promoter and *lac* promoters. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 80: 21-25.

Dubnau, D. and Devidoff-Abelson, R. 1971. Fact of Transforming DNA Following Uptake by Competent *Bacillus subtilis*. Journal of Molecular Biology 56: 209-221.

Fahrney, D.E. and Gold, A.M. 1963. Sulfonyl Fluoride as Inhibitors of Esterases I Rates of Reaction with Acetylcholineesterase, α-chymotrypsin, and trypsin.. Journal of American chemistry Society 85 : 997-1,000.

Frangioni, J.V. and Neel, B.G. 1993. Solubilisation and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-transferase (pGEX) Fusion Proteins. Analytical Biochemistry 210: 179-187.

Germino, J. and Bastia, D. 1984. Rapid Purification of a Cloned Gene Product by Genetic Fusion a Site -specific Proteolysis. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 81: 4692-4696.

Glaser, P., et al. 1993. *Bacillus subtilis* Genome Project: Cloning and Sequencing of the 97 kb region from 325° to 333°. Molecular Microbiology 10(2): 371-384.

Goldberg, A.L. 1971. Effects of Protease Inhibitors on Protein Breakdown and Enzyme Induction in Starving *Escherichia coli*. Nature N.Biology 234 : 51-52.

Gryczan, S.C. and Dubnau, D. 1978. Characterization of *Staphylococcus aureus* Plasmids Introduced by Transformation into *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 134: 318-329.

Guan, K.L. and Dixon, J.E. 1991. Eukaryotic Proteins Expressed in *Escherichia coli*: an Improved Thrombin Cleavage and Purification Procedure of Fusion Proteins with Glutathione S-transferase. Analytical Biochemistry 192: 262-267.

Hanahan, D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. Journal of Molecular Biology 166: 557-580.

Hakes, D.J. and Dixon. J.E. 1992. New Vectors for High Level Expression of Recombinant Proteins in Bacteria. Analytical Biochemistry 202: 293-298.

Harris, E.L.V. and Angal, S. 1989. Protein purification methods: a practical approach. New York. IRL Press at Oxford University Press.

Hartley, B.S. 1960. Proteolytic Enzyme. Annual Review of Biochemistry 29: 45-72.

Hartman, J., Daram, P., Frizzell, R.A., Rado, T., Benos, D.J. and Sorscher, E.J. 1992. Affinity Purification of Insoluble Recombinant Fusion Proteins Containing Glutathione S-transferase. Biotechnology and Bioengineering 39: 828-832.

He, X. S., Brucknen, R.and Doi, R. H. : The Protease genes of *Bacillus subtilis*. Research Microbiology 142(1991) 797-803.

Higgins, D.G., and Sharp, P.M. 1988. CLUSTAL: a Package for Performing Multiple Sequence Alignment on a Microcomputer. Gene 73:237-244.

Huan, R.S. and Moss, J. 1992. Ligation Independent Cloning of Glutathione S-transferase Fusion Genes for Expression in *Escherichia coli*. Gene 112: 37-43.

Jukubke, H.D. and Konnecke, A. 1987. Peptide Synthesis Using Immobilized Proteases.Methods in Enzymology 136: 178-187.

Kaelin, Jr., W. G.,Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Keya, F.J. and Livingston, D.M. 1991. Identification of Cellular Proteins That Can Interact Specifically with the T/E1A-Binding Region of the Retinostoma Gene Product. Cell 64: 521-525.

Kaelin,Jr., W. G., et al. 1992. Expression Cloning of a cDNA Encoding a Retinoblastoma-Binding Protein with E2F-like Properties. Cell 70: 351.

Kanako, R., Koyama, N., Tsai, Y.C., Jung, R.Y., Yoda, K. and Yamasaki, M. 1989. Molecular Cloning of the Structural Gene for Alkaline Elastase YaB, a New Subtilisin Produced by an Alkalophilic *Bacillus* Strain. Journal of Bacteriology 171: 5232-5236.

Koide, L.T., Nakamura, A., Uozumi, T. and Beppu, T. 1986. Cloning and Sequencing of the Major Intracellular Serine Protease Gene of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 167(1): 110-116.

Kubo, M. and Imanaka, T. 1988. Cloning and Nucleotide of the Highly Thermostable Neutral Protease Gene from *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Genetic Microbiology 134: 1883-1892.

Levy, P.L., Pangburn, M.K., Burstein, Y., Ericsson, L.H., Neurath, H. and Walsh, K.A. 1975. Evidence of Homologous Relationship between Thermolysin and Neutral Protease A of *Bacillus subtilis* Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 72(11):4341-4345.

Maina, C.V., Riggs, P.D., Grandea III, A.G., Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A. and Guan, G. 1988. An *Escherichia coli* Vector to Express and Purify Foreign Proteins by Fusion to and Separation from Maltose-binding Protein. Gene 74 : 365-373.

Maniatis, T.,Sambrook, J and Fritsch,E.F. 1982. Molecular cloning. A Laboratory Mannual. New York:Cold Spring Habor Laboratory Press.

Milano, A. Manachini, P.L. Parini, C. and Riccardi, G. 1994. Sequence of the Gene Endcoding an Alkaline Serine Protease of Thermophilic *Bacillus smithii.* Gene 145: 149-150.

Morihara, K. 1974. Comparative Specificity of Microbial Proteinases. Advance Enzymology 44: 179-243.

Nagai, K., Perutz, M.F. and Poyart, C. 1985. Oxygen Binding Properties of Human Mutant Hemoglobins Synthesized in *Escherichia coll.* Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 82: 7252-7255.

Park, S.S., Wong, S.L., Wang, L.F. and Doi, R.H. 1989. *Bacillus subtilis* Subtilisin Gene (*arpE*) Is Expressed from a $\sigma^{A}(\sigma^{B})$ Promoter In Vitro and In Vivo. Journal of Bacteriology 171: 2657-2665.

Priest. F.G. 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus.* Bacteriology Review 41 : 711-753.

Simons, P.C. and Vander Jagt, D.L. 1981. Purification of Glutathione S-transferase by Glutathione Affinity Chromatograpy. Methods in Enzymology 77: 235-237.

Sloma, A., Rufo, Jr., G.A., Theriault, K.A., Dwyer, M., Wilson, S.W. and Pero, J. 1991. Cloning and Characterization of the Gene for an Additional Extracellular Serine Protease of *Bacillus subtilis.* Journal of Bacteriology 173(21): 6889-6895.

Sloma, A., Ally, A., Ally, D. and Pero, J. 1988. Gene Ending a Minor Extracellular Protease in *Bacillus subtills.* Journal of Bacteriology 170(12): 5557-5563.

Sloma, A., Rudolph, G.A., Rufo, Jr., G.A., Sullivan, B.J., Theriault, K.A., Ally, D. and Pero, J. 1990. Gene Endcoding a Novel Extracellular Metalloprotease in *Bacillus subtilis.* Journal of Bacteriology 172 : 1024-1029.

Smith, D.B. 1993. Purification of Glutathione S-transferase Fusion Protein. Methods in Molecular and Cellular Biology 4: 220-229.

Smith, D.B. and Johnson, K.S. 1988. Single-step Purification of Polypeptides Expressed in *Escherichia coli* as Fusions with Glutathione S-transferase. Gene 67: 31-40.

Smith, D.B., Berger, L.C. and Wildman, A.G. 1993. Modified Glutathione S-transferase Fusion Proteins for Simplified Analysis of Protein-Protein Interactions. Nucleic Acid Research 21: 359-360.

Smith, D.B., Davern, K.M., Board, P.G., Tiu, W.U., Garcia, E.G. and Mitchell, G.F. 1986. M_r 26,000 Antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by Resistant WEHI 129/J Mice is a Parasite Glutathione S-transferase. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 83: 8703-8707.

Smith, D.B., Rubira, M.R., Simpson, R.J., Davern, K.M., Tiu, W.U., Board, G.F. 1988. Expression of an Enzymatically Active Parasite Molecule in *Escherichia coli*: *Schistosoma japonicum* Glutathione S-transferase. Molecular and Biochemical Parasitology 27: 249-256.

Southern, E.M. 1975. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. Journal of Molecular Biology 98: 503-517.

Stahl, M.L. and Ferrari, E. 1984. Replacement of the *Bacillus subtilis* Subtilisin Structural Gene with an In Vitro-Derived Deletion Mutation. Journal of Bacteriology 158(2):411-418.

Uehara, H., K. Yamane, and B. Maruo. 1979. Thermosense Extracellular Neutral Protease in *Bacillus subtilis* : Isolation, Characterization, and Genetics. Journal of Bacteriology 139 : 583-590.

Vasantha, N., Thompson, L.D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle,J. and Filpula, D. 1984. Genes for Alkaline Protease and Neutral Protease from *Bacillus amyloquefaciens* Contain a Large Open Reading Frame Between the Regions Coding for Signal Sequence and Mature Protein. Journal of Bacteriology 159(3):811-819.

Wu, Z.R., Qi, B.J., Jiao, R.Q., Chen, F.D. and Wang, L.F. 1991. Development of a Novel *Bacillus subtilis* Cloning System Employing Its Neutral Protease as Screen Marker. Gene 106: 103-107

Yang, M.Y., Ferrari, E. and Henner, D.J. 1984. Cloning of the Neutral Protease Gene of *Bacillus subtilis* and the Use of the Cloned Gene to Create an In Vitro-Derived Deletion Mutation. Journal of Bacteriology 160(1):15-21.

Yamagata, Y., Abe, R., Fujita, Y. and Ichishima, E. 1995. Molecular cloning and Nucleotide Sequence of the 90k Serine Protease Gene, *hspK*, from *Bacillus subtilis* (*natto*) No. 16. Current Microbiology 31: 340-344.

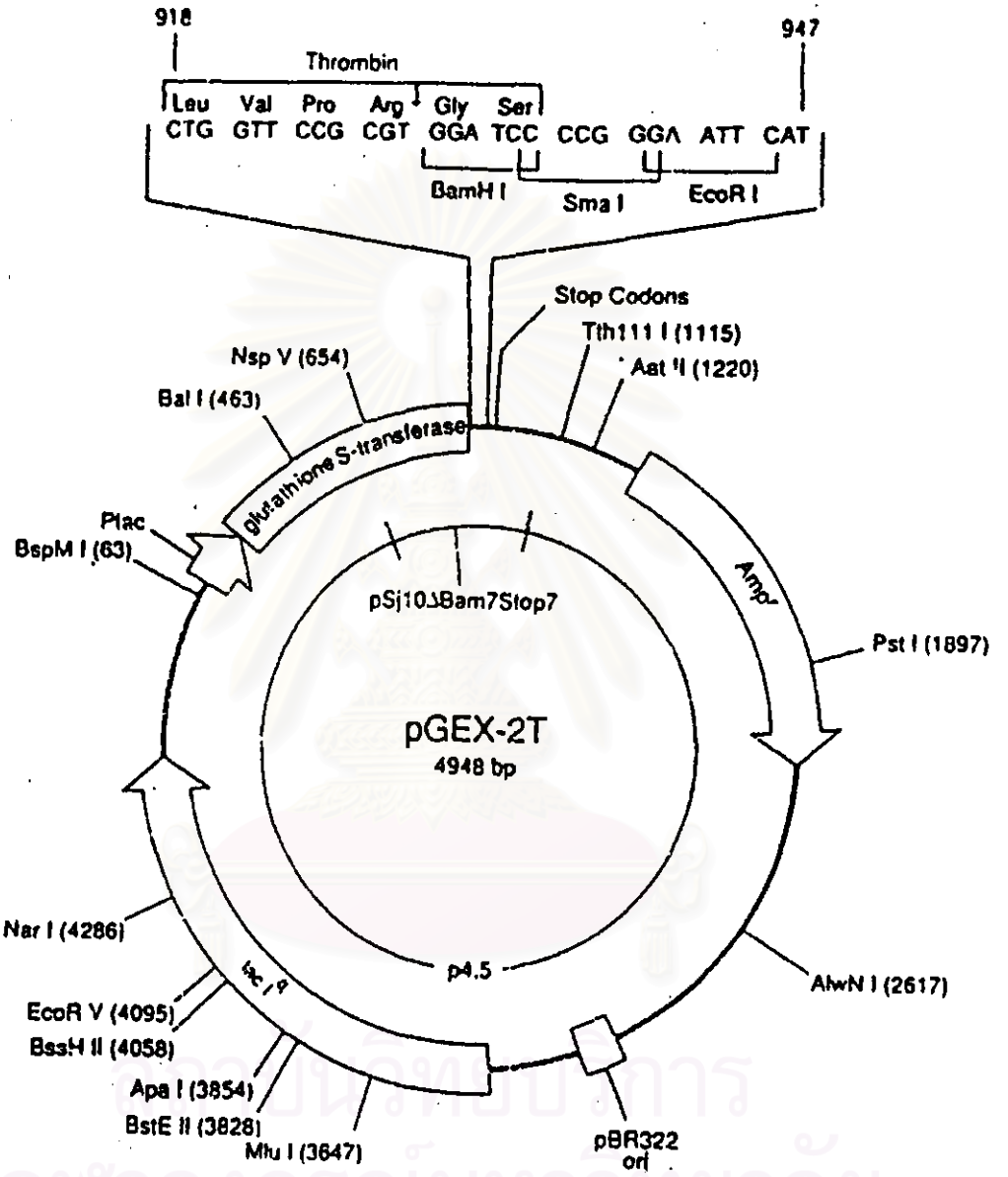
Zhu, Z., Andrisani, O.M. Pot, D.A. and Dixon, J.E. 1989. Purification and Characterization of a 43-kDa Transcription Factor Required for Rat Somatostatin Gene Expresstion. Journal of Biological chemistry 264(11): 6550-6556.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะ pGEX-2T (Smith และคณะ, 1988)



pGEX-2T มีบริเวณที่สำคัญต่าง ๆ ดังนี

บริเวณยีน glutathione S-transferase : *tac* promoter: -10: 205-211; -35: 183-188; *lac* operator: 217-237; **ตำแหน่งที่** Ribosome **จะมาเกาะในการสังเคราะห์** GST: 244; Start codon (ATG) for GST: 258; **บริเวณที่สามารถถูกตัดได้ด้วยทรอมบิน** : 918-935

MSC: 930-945

บริเวณยีน β-lactamase : Promoter: -10: 1309-1314; -35: 1286-1291; Start codon (ATG): 1356; Stop codon (TAA): 2214

บริเวณยีน *lacI*^{q} gene : Start codon (GTG): 3297; Stop codon (TGA): 4377

บริเวณการถอดแบบของพลาสมิด : ตำแหน่งเริ่มต้นการถอดแบบ : 2974; บริเวณที่จำเป็นต่อการถอดแบบ : 2281-2977

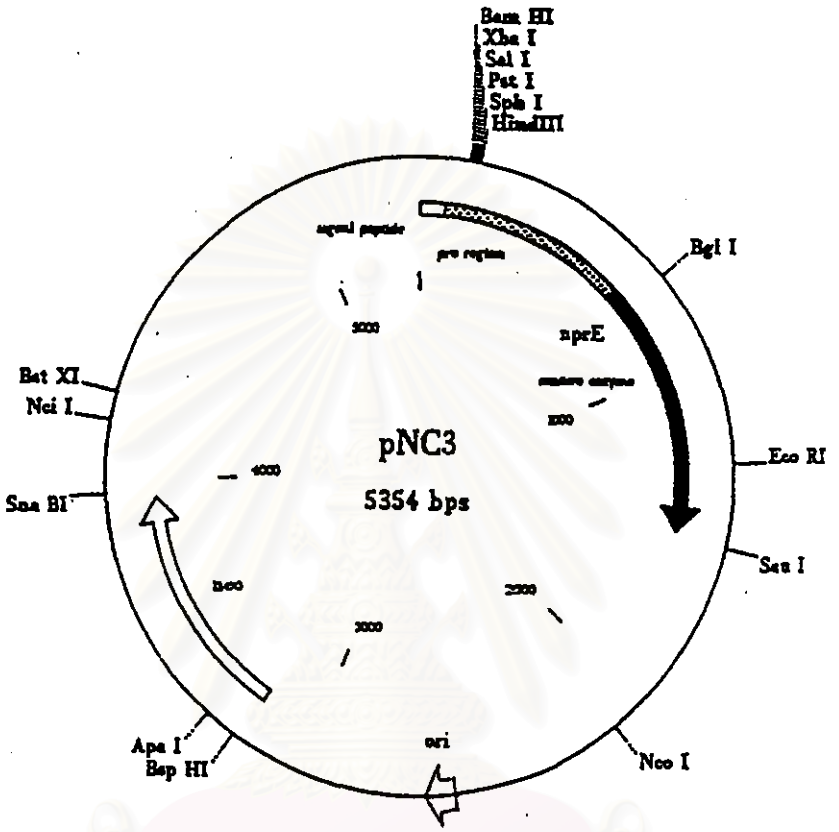
ไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับเบส (Sequencing primers): 5' pGEX Sequencing Primer เกาะที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 869 ถึง 891; 3' pGEX Sequencing Primer เกาะที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 1020 ถึง 998.

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ไม่มีตำแหน่งบน pGEX-2T (No sites): *Acc* I, *Acc65* I, *Afl* II, *Age* I, *Asc* I, *Ava* III, *Avr* II, *Bbr*P I, *Bfr* I, *Bgl* II, *Bpu*1102 I, *Bsa*B I, *Bse*A I, *Bsp*D I, *Bsp*E I, *Bst*1107 I, BsiW I, *Bsm* I, *Bsp*M II, *Cla* I, *Dra* III, *Eag* I, *Ecl*136 II, *Eco*47 III, *Esp* I, *Hind* III, *Kpn* I, *Mam* I, *Mun* I, *Nae* I, *Nco* I, *Nde* I, *Ngo*M I, *Nhe* I,*Not* I, *Nru* I, *Nsi* I, *Pac* I, *Pae*R7 I, *Pme* I, *Pml* I, *Ppu*M I, *Rsr* II, *Sac* I, *Sac* II, *Sal* I, *Sce* I, *Sgr* I, *Sna*B I, *Spe* I, *Sph* I, *Spl* I, *Spo* I, *Srf* I, *Sse*8387 I, *Stu* I, *Sty* I, *Xba* I, *Xho* I

เอนไซม์ตัดจำเพาะหนึ่งตำแหน่ง (One site): *Aat* II (1220), *Alw*N I (2617), *Apa* I (3854), *Asu* II (654), *Ava* I (935), *Bal* I (463), *Bam*H I (930), *Ban* II (3854), *Bsa* I (2071), *Bse*A I (1123), *Bpm* I (3500), *Bsp*M I (63), *Bss*H II (4056), *Bst*B I (654), *Bst*E II (3828), *Bsu*36 I (4739), *Dsa* I (4848), *Eam*1105 I (2138),*Eco*N I (264), *Eco*R I (940), *Eco*R V (4095), *Hpa* I (4151), *Kas* I (3223), *Mlu* I (3647), *Msc* I (463), *Nar* I (4286), *Pfl*M I (3223), *Pst* I (1897), *Sau* I (4739), *Sma* I (935), *Swa*I I (682), *Tth*111 I (1115), *Xma* I (935)

เอนไซม์ตัดจำเพาะสองตำแหน่ง (Two sites): *Bcl* I (692, 3661), *Bgl* I (2019, 4662), *Bsr*F I (2058, 3333), *Cfr*10 I (2058, 3333), *Dra* II (289, 1162), *Drd* I (1060, 2923), *Eco*57 I (1456, 2504), *Eco*O109 I (289, 1162), *Esp*3 I (1015, 4258), *Fsp* I (1918, 4656), *Pvu* I (1771, 4636), *Sca* I (829, 1660), *Ssp* I (164, 1336), *Xmn* I (647, 1539)

ภาคผนวกที่ 2 แผนที่เรสทริกชันและการสร้างพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม pNC3 (Wu, Z.R. และคณะ, 1991)

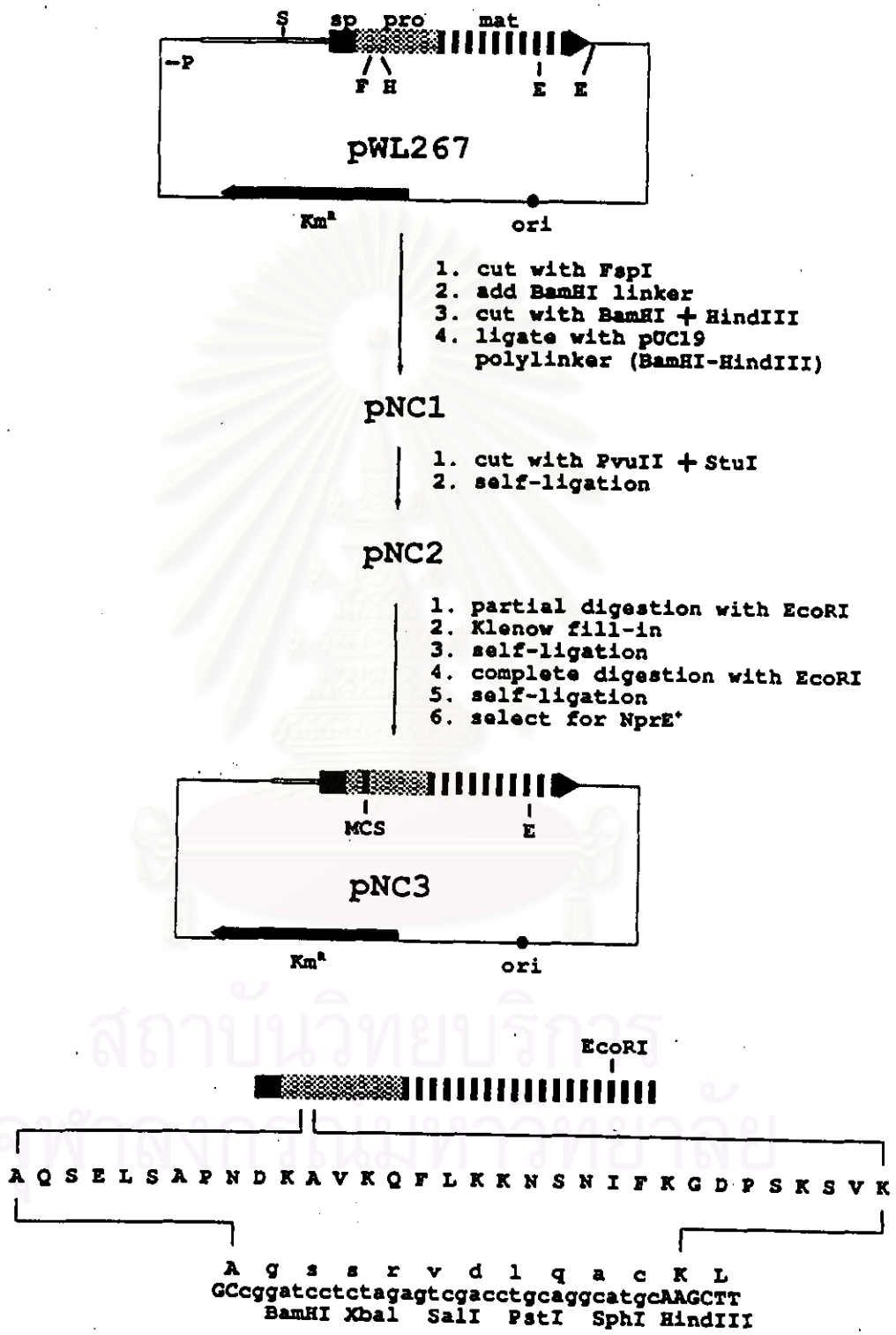


DESCRIPTION

size :	5,354 bp
construction :	Wu, Z.R., et al. 1991. Gene 106 : 103-107
replication	rolling circle (pUB-like)
copy number :	high

FEATURES

neo	kanamycin/neomycin resistance
nprE	neutral protease structural gene
SP	signal peptide portion of *nprE*
PRO	pro-peptide portion of *nprE*
ori	pUB110 positive origin of replication


S
sp
pro
mat
-P
F H
E E
pWL267
Km^R
ori
1. cut with FspI
2. add BamHI linker
3. cut with BamHI + HindIII
4. ligate with pUC19
polylinker (BamHI-HindIII)
pNC1
1. cut with PvuII + StuI
2. self-ligation
pNC2
1. partial digestion with EcoRI
2. Klenow fill-in
3. self-ligation
4. complete digestion with EcoRI
5. self-ligation
6. select for NprE+
MCS
E
pNC3
Km^R
ori
EcoRI
A Q S E L S A P N D K A V K Q F L K K N S N I F K G D P S K S V K
A g s s r v d l q a c K L
GCcggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcAAGCTT
BamHI XbaI SalI PstI SphI HindIII

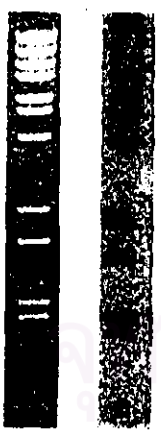
ภาคผนวกที่ 3 ดีเอ็นเอมาตรฐานของฟาจแลมบ์ดา (λ-DNA)

ดีเอ็นเอของฟาจแลมบ์ดา (λ-DNA) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน (λ/*Hind*III) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 8 ขนาด ตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis (Rodrigues และ Tait, 1983)

Lambda DNA-*Hind* III Digest visualized by ethidium bromide staining (left) and chemiluminescent detection of biotinylated form (right) 1.0% agarose gel.

Fragment	Base Pairs	Daltons
1	23,130	15.00×10^6
2	9,416	6.12×10^6
3	6,557	4.26×10^6
4	4,361	2.83×10^6
5	2,322	1.51×10^6
6	1,027	1.32×10^6
7	564	0.37×10^6
8	125	0.08×10^6

ดีเอ็นเอของฟาจแลมบ์ดา (λ-DNA) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*EII อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 60 °C ข้ามคืน (λ/*Bst*EII) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 14 ขนาด ตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis (New England Biolabs, 1993)



Lambda DNA-*Bst*E II Digest visualized by ethidium bromide staining (left) and chemiluminescent detection of biotinylated form (right) 1.0% agarose gel.

Fragment	Base Pairs	Daltons
1	8,454	5.49×10^6
2	7,242	4.71×10^6
3	6,369	4.14×10^6
4	5,686	3.70×10^6
5	4,822	3.13×10^6
6	4,324	2.81×10^6
7	3,675	2.38×10^6
8	2,323	1.51×10^6
9	1,929	1.25×10^6
10	1,371	0.89×10^6
11	1,264	0.82×10^6
12	702	0.46×10^6
13	224	0.15×10^6
14	117	0.08×10^6

ภาคผนวกที่ 4 ตารางแสดงการเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะ (Maniatis et al., 1989)

ANTIBIOTICS

TABLE A.1 Antibiotic Solutions

	Stock solution[a]		Working concentration	
	concentration	storage	stringent plasmids	relaxed plasmids
Ampicillin	50 mg/ml in H_2O	−20°C	20 μg/ml	60 μg/ml
Carbenicillin	50 mg/ml in H_2O	−20°C	20 μg/ml	60 μg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in ethanol	−20°C	25 μg/ml	170 μg/ml
Kanamycin	10 mg/ml in H_2O	−20°C	10 μg/ml	50 μg/ml
Streptomycin	10 mg/ml in H_2O	−20°C	10 μg/ml	50 μg/ml
Tetracycline[b]	5 mg/ml in ethanol	−20°C	10 μg/ml	50 μg/ml

[a]Stock solutions of antibiotics dissolved in H_2O should be sterilized by filtration through a 0.22-micron filter. Antibiotics dissolved in ethanol need not be sterilized. Store solutions in light-tight containers.
[b]Magnesium ions are antagonists of tetracycline. Use media without magnesium salts (e.g., LB medium) for selection of bacteria resistant to tetracycline.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 5 ข้อมูลของสารกัมมันตภาพรังสี (Maniatis et al., 1989)

ก. ตารางแสดงข้อมูลของสารกัมมันตภาพรังสี

TABLE B.6 Isotopic Data

^{3}H		^{35}S		^{32}P		^{125}I		^{131}I	
time (years)	activity remaining (%)	time (days)	activity remaining (%)	time (days)	activity remaining (%)	time (days)	activity remaining (%)	time (days)	activity remaining (%)
1	94.5	2	98.4	1	95.3	4	95.5	0.2	98.3
2	89.3	5	96.1	2	90.8	8	91.2	0.4	96.6
3	84.4	10	92.3	3	86.5	12	87.1	0.6	95.0
4	79.8	15	88.7	4	82.4	16	83.1	1.0	91.8
5	75.4	20	85.3	5	78.5	20	79.4	1.6	87.2
6	71.3	25	82.0	6	74.8	24	75.8	2.3	81.2
7	67.4	31	78.1	7	71.2	28	72.4	3.1	76.7
8	63.7	37	74.5	8	67.8	32	69.1	4.0	71.0
9	60.2	43	71.0	9	64.7	36	66.0	5.0	65.2
10	56.9	50	67.0	10	61.5	40	63.0	6.1	59.3
11	53.8	57	63.6	11	58.7	44	60.2	7.3	53.4
12	50.9	65	59.6	12	55.9	48	57.4	8.1	50.0
12.3	50.0	73	56.0	13	53.2	52	54.8		
		81	52.5	14	50.7	56	52.4		
		87.1	50.0	14.3	50.0	60	50.0		

One curie (Ci) is equivalent to the amount of an isotope undergoing 3.7×10^{10} nuclear disintegrations per second (2.22×10^{12} disintegrations/minute). 1 Ci = 3.7×10^{10} becquerels (Bq).

1 Bq = 2.7×10^{-11} Ci
1 μCi = 37×10^{3} Bq = 37 kBq = 2.22×10^{6} dpm
1 mCi = 37×10^{6} Bq = 37 MBq = 2.22×10^{9} dpm
1 Ci = 37×10^{9} Bq = 37 GBq = 2.22×10^{12} dpm

ข. รูปแสดงการแผ่กัมมันตภาพรังสีเมื่อทำออโตเรดิโอกราฟ

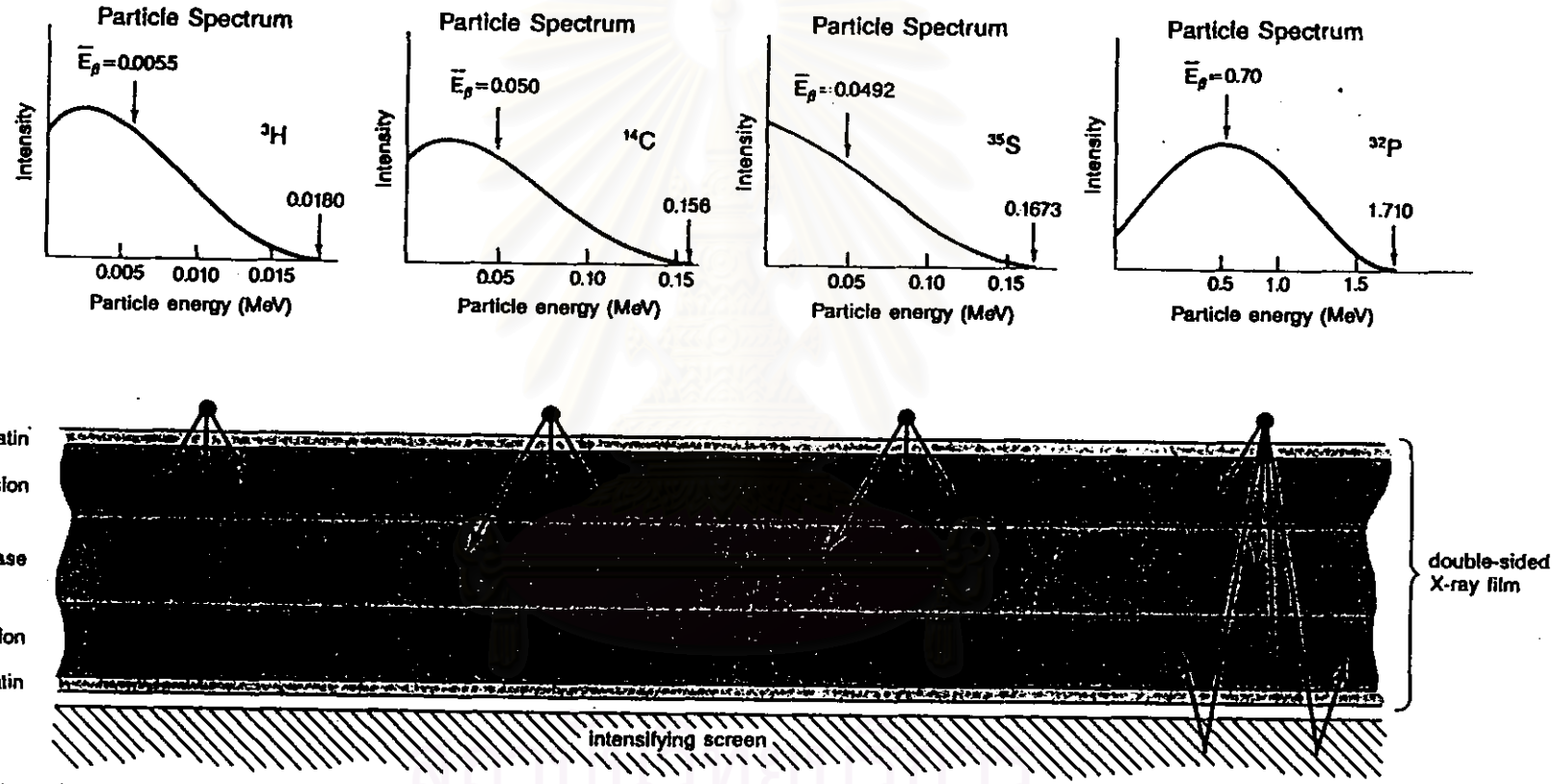


FIGURE E.3

Energy of radiation emitted by commonly used isotopes. The graphs in the upper part of the figure show the spectra of energies carried by particles emitted by decaying radioactive isotopes. In each case, the arrow marks the average energy per particle. The diagram in the lower part of the figure shows the depth to which commonly used isotopes penetrate autoradiographic film.

ค. รูปแสดงการตกตะกอนของอะตอมเงิน (silver atom) เมื่อทำออโตเรดิโอกราฟ

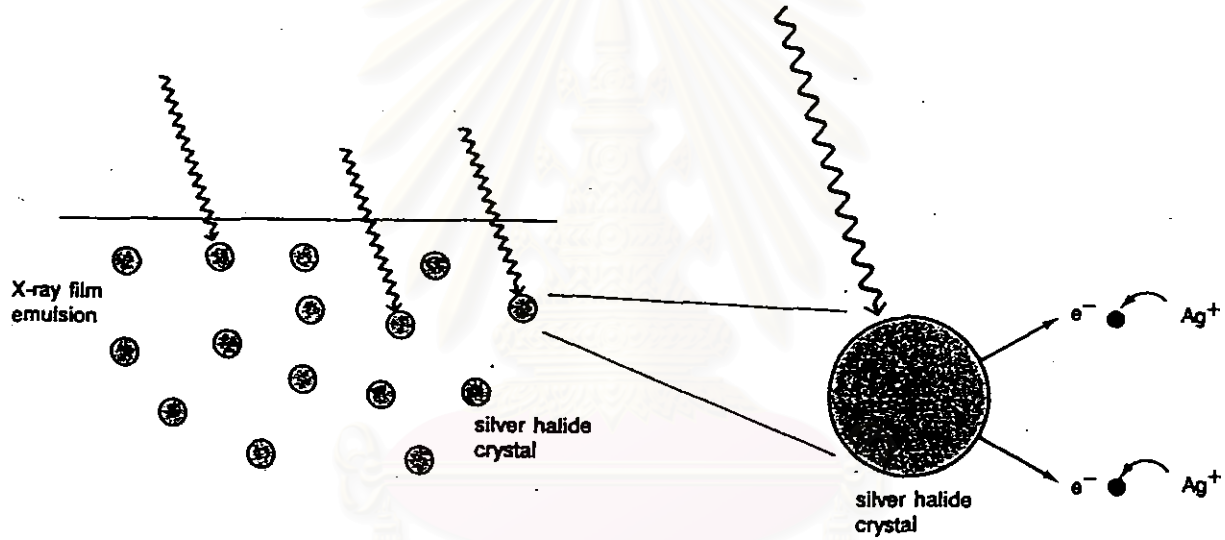
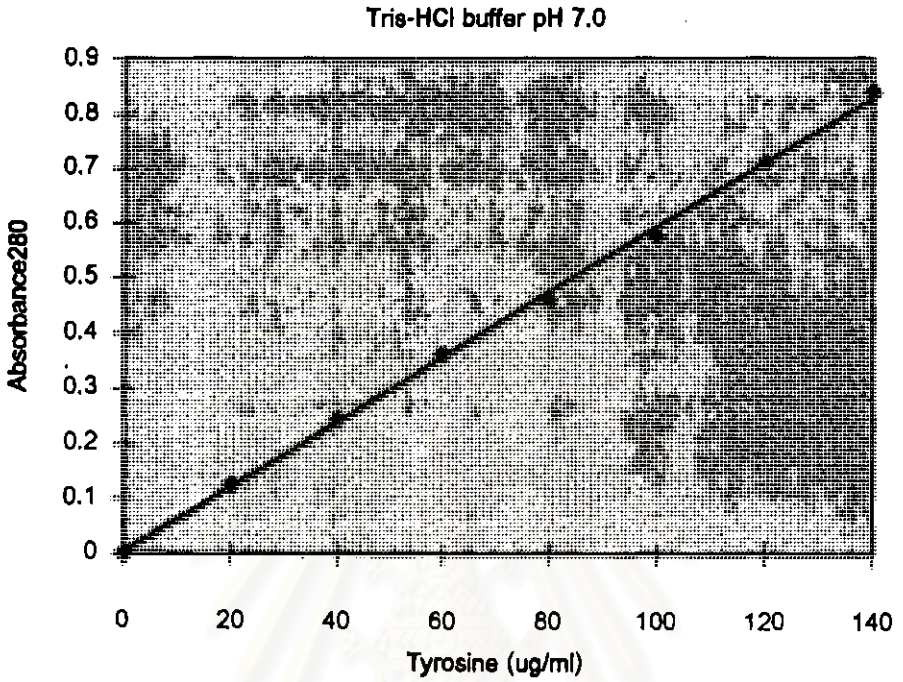
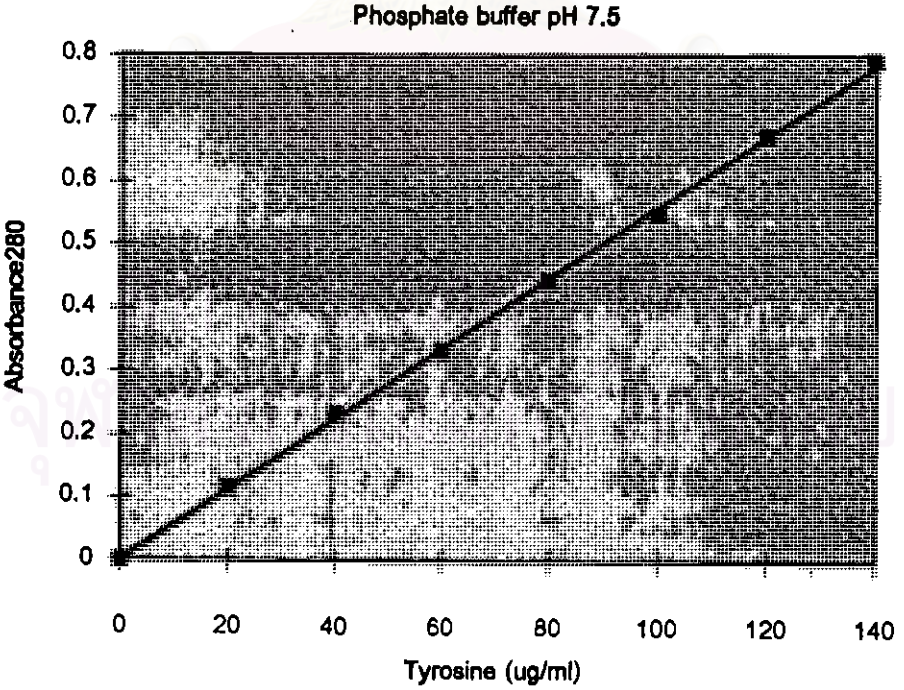


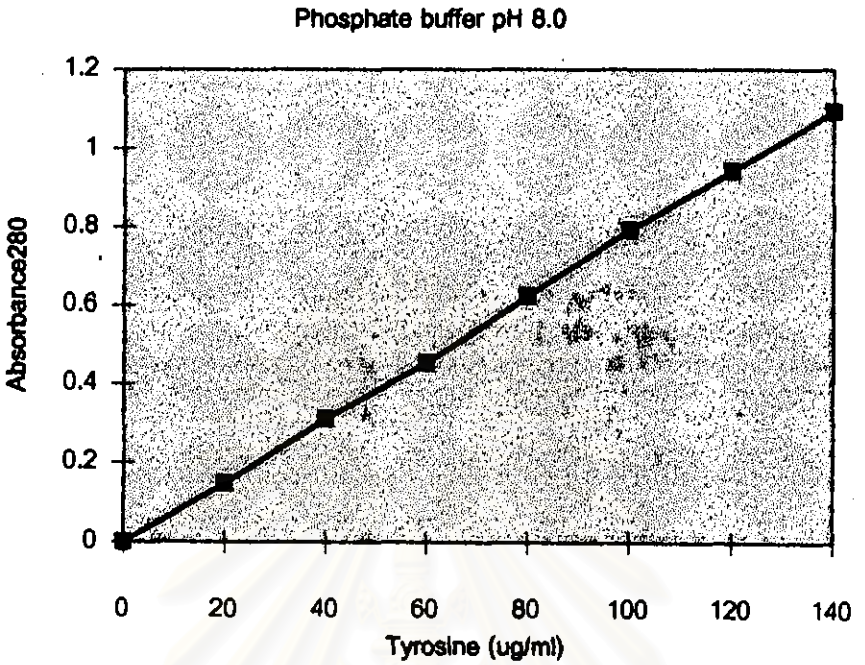
FIGURE E.2
Events leading to the formation of an autoradiographic image. The diagram shows that particles entering autoradiographic film cause ejection of electrons from silver halide crystals. These electrons attract positively charged silver ions, generating precipitates of silver atoms.

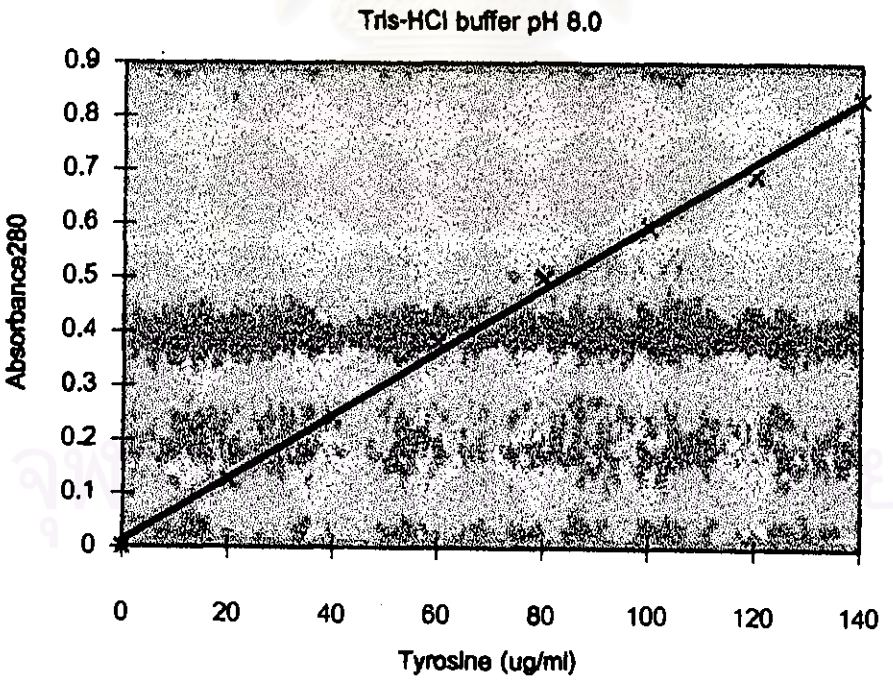
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

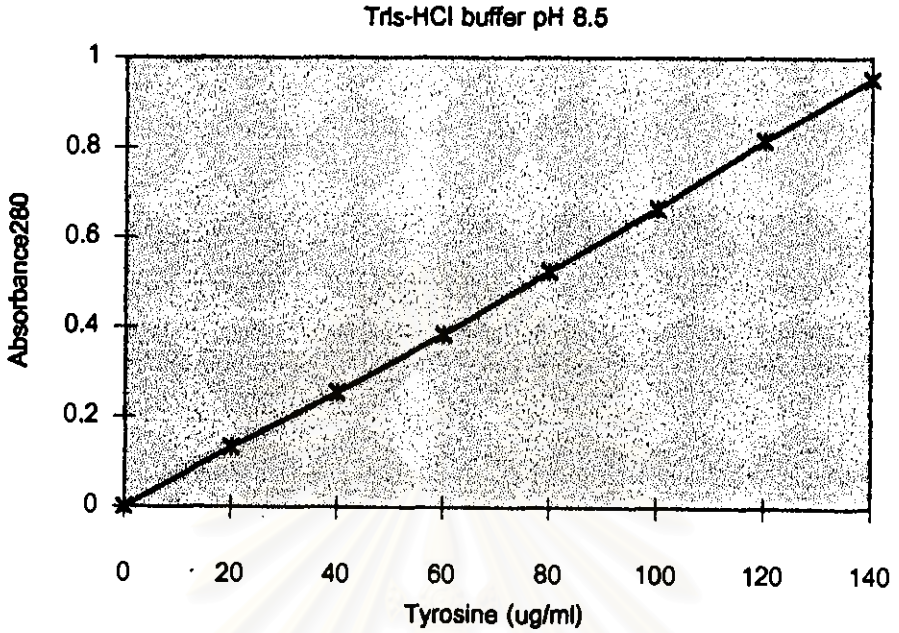
ภาคผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของสารละลายไทโรซีนความเข้มข้น 0-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่า pH ต่าง ๆ กัน

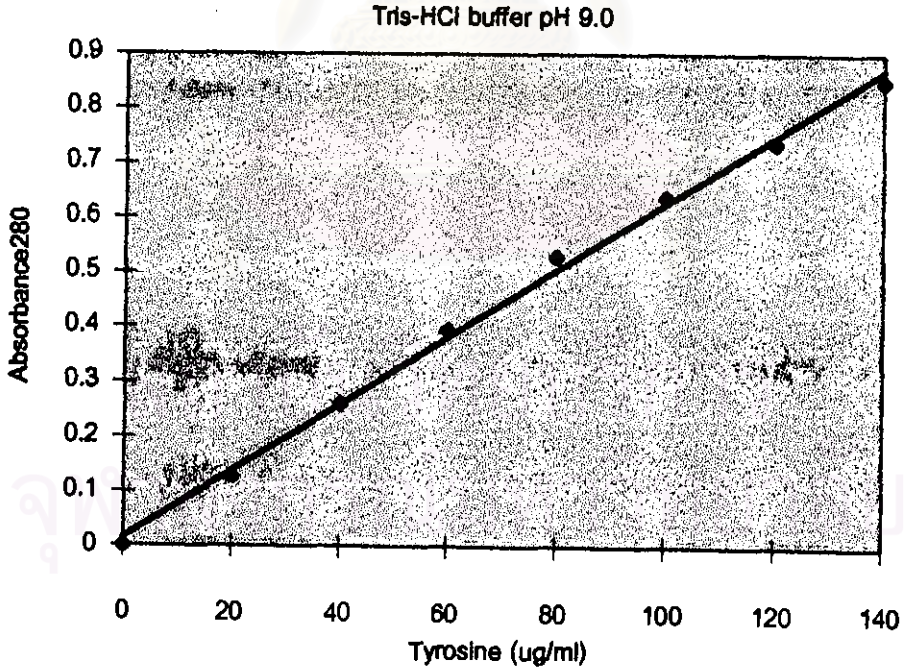


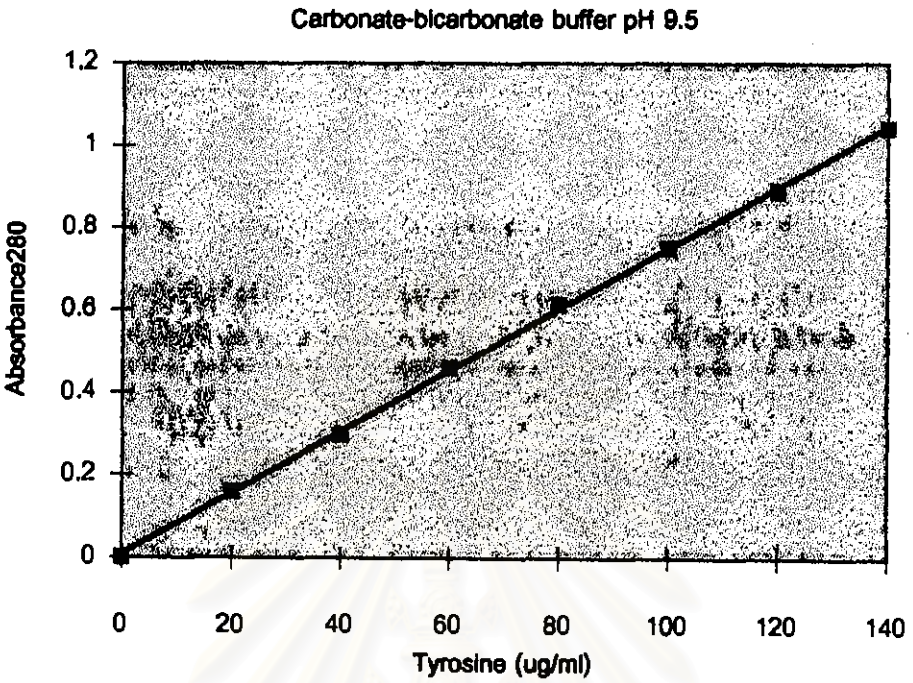


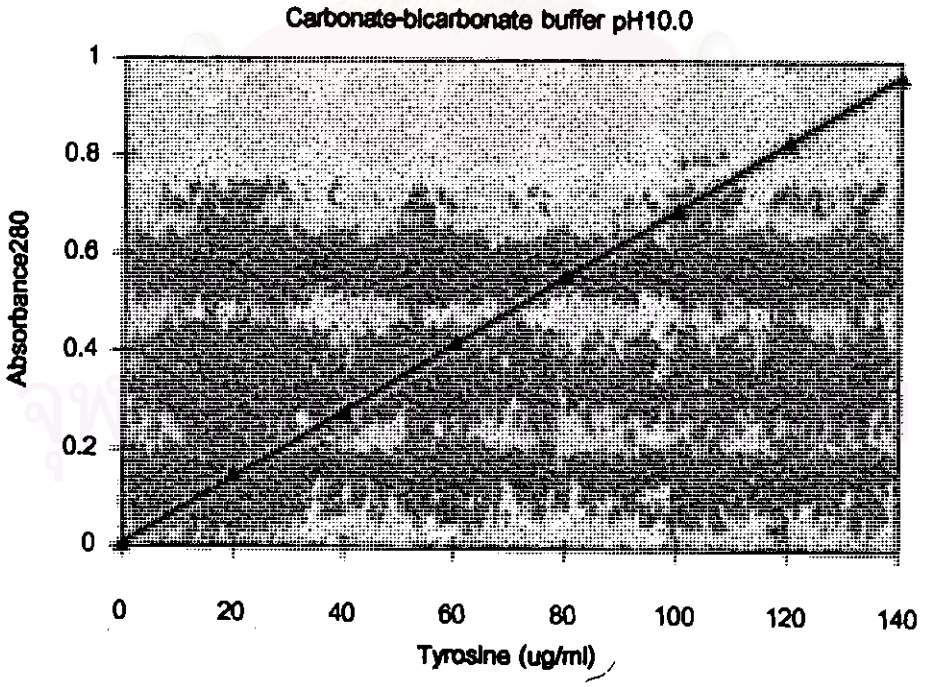

Phosphate buffer pH 8.0
Absorbance280
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tyrosine (ug/ml)

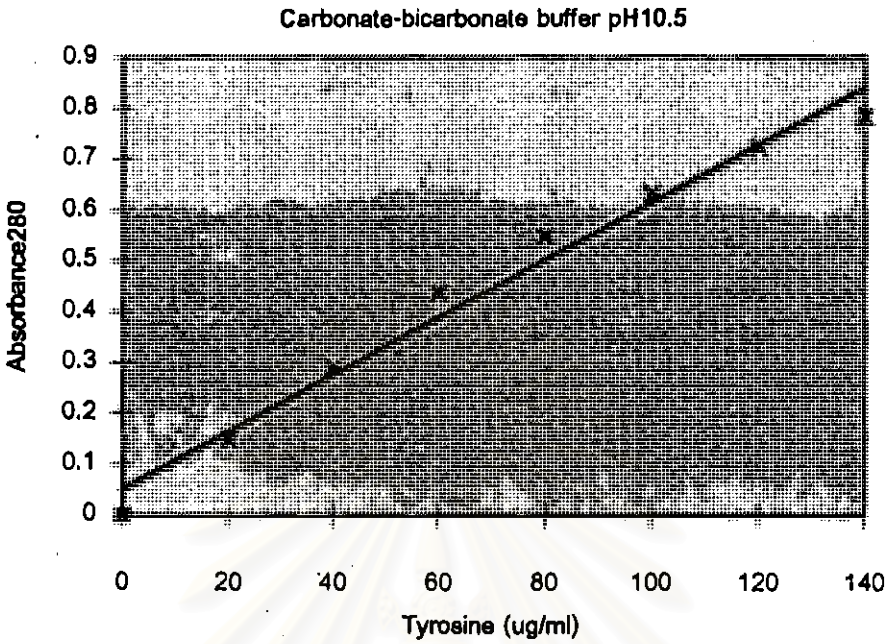

Tris-HCl buffer pH 8.0
Absorbance280
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tyrosine (ug/ml)

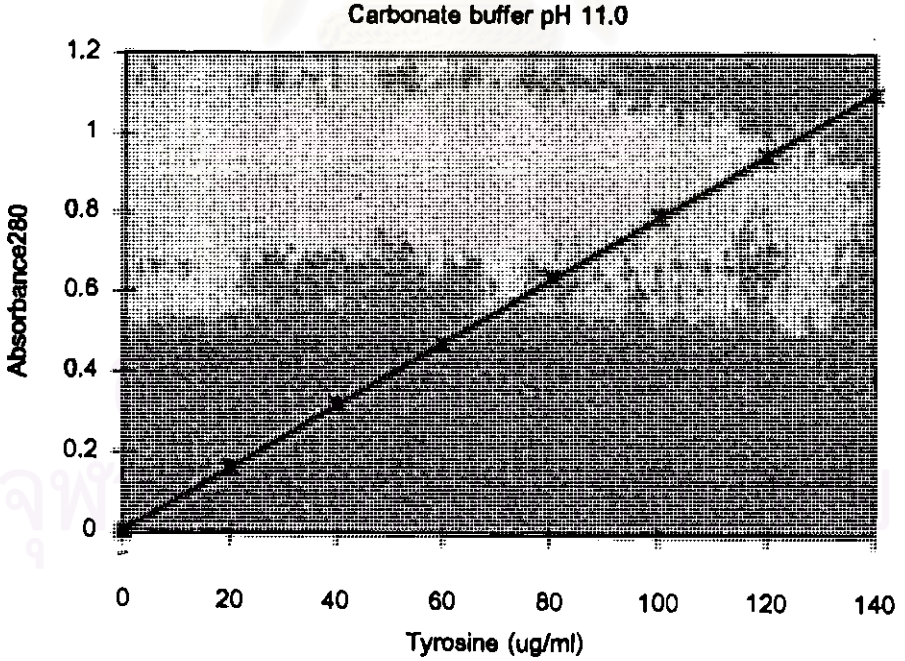

Tris-HCl buffer pH 8.5
Absorbance280
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tyrosine (ug/ml)


Tris-HCl buffer pH 9.0
Absorbance280
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tyrosine (ug/ml)

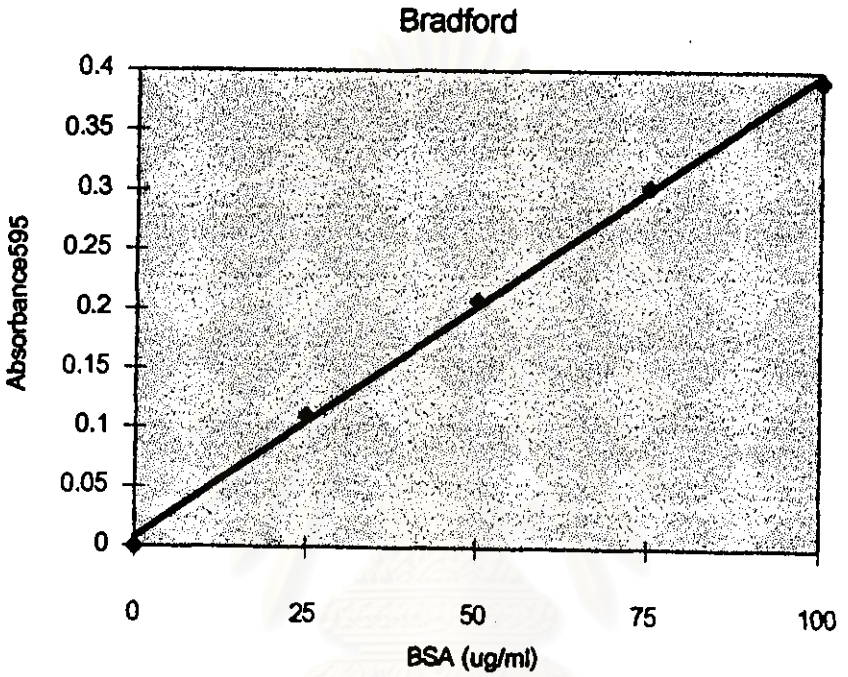

Carbonate-bicarbonate buffer pH 9.5
Absorbance280
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tyrosine (ug/ml)


Carbonate-bicarbonate buffer pH10.0
Absorbance280
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tyrosine (ug/ml)


Carbonate-bicarbonate buffer pH10.5
Absorbance280
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tyrosine (ug/ml)


Carbonate buffer pH 11.0
Absorbance280
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Tyrosine (ug/ml)

<u>ภาคผนวกที่ 7</u> กราฟมาตรฐานแสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ของโปรตีนมาตรฐาน BSA เข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 8 การเตรียมสารละลายต่าง ๆ ในการทดลอง

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani medium)

(1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl)

1.1.1 อาหารเหลว (LB broth)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth จำนวน 100 มล. โดยชั่ง

bacto-tryptone	1.0	กรัม
bacto-yeast extract	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. และปรับค่า pH ให้เป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.1.2 อาหารแข็ง (LB agar)

ชั่งวุ้น (bacto-agar) จำนวน 1.5 กรัม (1.5% w/v) ละลายในอาหารเหลว (LB broth) 100 มล. นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ปล่อยให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50°ซ จึงเทลงในจานเลี้ยงเชื้อเป็น agar plate หรือหลอดทดลองเป็น agar slant ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ปล่อยให้อาหารแข็งตัวแล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซม

2.1 สารละลายบัฟเฟอร์ SET (20% sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM EDTA)

เตรียมสารละลายจำนวน 50 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลีเอส โดยผสม

25% sucrose	40	มล.
1 M Tris-HCl, pH 7.6	2.5	มล.
0.5 M EDTA, pH 8.0	5	มล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	2.5	มล. เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.2 สารละลายซูโครส 25 เปอร์เซ็นต์ (25% sucrose)

เตรียมสารละลายจำนวน 50 มล. โดยชั่งน้ำตาลซูโครส 1.25 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลีเอสโดยการอบฆ่าเชื้อ

ด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

2.3 สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 7.6 (1 M Tris-HCl, pH 7.6)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง tris (hydroxymethyl)-aminomethane 12.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มล. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เข้มข้น 6 มล. ปล่อยไว้จนถึงอุณหภูมิห้อง ปรับค่า pH ให้เป็น 7.6 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอส โดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.4 สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0 (0.5 M EDTA, pH 8.0)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง disodium ethylene diamine tetraacetate.$2H_2O$ จำนวน 18.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 2 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5 สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme 5 mg/ml ใน TEN buffer)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยชั่ง Lysozyme จำนวน 50 มก. ละลายใน TEN buffer ปริมาตร 10 มล. แบ่งเป็นส่วน ๆ ละ 0.5 มล. สามารถเก็บได้นานที่ -20°ซ หลังจากละลายใช้ได้เพียงครั้งเดียว

2.6 สารละลายบัฟเฟอร์ TEN (TEN buffer) (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยผสม

1 M Tris-HCl, pH 7.6	0.1	มล.
0.5 M EDTA, pH 8.0	0.02	มล.
5 M NaCl	0.02	มล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	9.86	มล.

รวมปริมาตร 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.7 <u>สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์</u> (5 M NaCl)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 29.22 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.8 <u>สารละลายบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอส (RNase buffer)</u> (0.1 M sodium acetate pH 7.4, 0.3 mM EDTA)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยผสม

1 M sodium acetate, pH 7.4	1	มล.
0.5 M EDTA, pH 8.0	6	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มล. ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.9 <u>สารละลายโซเดียมอะซิเตท 1 โมลาร์, pH 7.4</u> (1 M sodium acetate,pH 7.4)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่งเกลือโซเดียมอะซิเตท ($CH_3COOH.3H_2O$) จำนวน 13.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 7.4 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก (glacial acetic acid) ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.10 <u>สารละลายอาร์เอ็นเอส</u> (Pancreatic Ribonuclease A 10 mg/ml ใน RNase buffer)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยชั่ง Pancreatic Ribonuclease A จำนวน 10 มก. ละลายใน RNase buffer ปริมาตร 1 มล. ก่อนใช้ทุกครั้งต้องต้มที่ 80°ซ นาน 10 นาที สามารถเก็บได้นานที่ -20°ซ

2.11 <u>สารละลาย 25% SDS</u>

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยชั่ง sodium dodecyl sulfate (sodium lauryl sulfate) จำนวน 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 90 มล. อุ่นที่ 68°ซ (ช่วยให้ละลายเร็ว ๆ) ปรับค่า pH เป็น 7.2 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นทีละหยด ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง และสามารถเจือจางให้เข้มข้น 10% ได้

2.12 สารละลายโปรเนส (Pronase 10 mg/ml ใน TEN buffer)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยชั่ง Pronase จำนวน 20 มก. ละลายใน TEN buffer ปริมาตร 10 มล. ก่อนใช้ทุกครั้งต้องอุ่นที่ 37°ซ นาน 15 นาที สามารถเก็บได้นานที่ -20°ซ

2.13 สารละลายบัฟเฟอร์ TE (TE buffer) (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยผสม

1 M Tris-HCl, pH 8.0	0.1	มล.
0.5 M EDTA, pH 8.0	0.02	มล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	10	มล.

หรือเตรียมเป็น stock 10X TE buffer 1,000 มล. โดยชั่ง

tris base	12.11	กรัม
Na_2EDTA	3.72	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง ปรับปริมาตรให้ เป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.14 สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 8.0 (1 M Tris-HCl, pH 8.0)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง tris (hydroxymethyl)-aminomethane จำนวน 12.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มล. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เข้มข้น 4.2 มล. ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง และทิ้งสารละลายเมื่อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

3. การเตรียมสารละลายสำหรับการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (agarose gel electrophoresis)

3.1 <u>การเตรียมอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์</u> (0.7% agarose)

เตรียมโดยชั่งอะกาโรสเจลจำนวน 0.7กรัม ละลายใน TBE buffer ปริมาตร 100 มล. ต้มให้เดือดและคนจนละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50^{0}ซ จึงเทลงในเจลแซมเบอร์ปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

3.2 <u>สารละลายบัฟเฟอร์ 10X และ 1X Tris-borate buffer (10X TB และ 1XTB buffer)</u> (89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, pH 8.3)

เตรียมเป็น stock 10X TB buffer ปริมาตร 1,000 มล. โดยชั่ง

tris base	108	กรัม
boric acid	55	กรัม
Na_2EDTA	93	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121^{0}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการใช้จึงเจือจางให้เป็น 1X TB โดยผสม 10X TB ปริมาตร 100 มล. กับน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 900 มล.

3.3 <u>สารละลายสี tracking dye</u> (0.025% bromphenol blue, 40% ficoll 400, 0.1% SDS)

เตรียมสารละลายสีจำนวน 10 มล. โดยชั่ง

bromphenol blue	2.5	มก.
ficoll 400	4	กรัม
SDS	50	มก.

ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มล. ผสมให้ละลายจนหมด

หมายเหตุใช้ tracking dye ปริมาตร 1 ใน 5 ของส่วนผสมที่เกิดปฏิกิริยา (reaction mixture)

3.4 <u>สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์</u> (ethidium bromide 2.5 µg/ml)

เตรียมสารละลายโดยชั่ง ethidium bromide จำนวน 2.5 มก. ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

4. การเตรียมสารละลายสำหรับการแยกดีเอ็นเอจากเจลด้วยกระแสไฟฟ้า (Electro-elution)

4.1 สารละลายฟีนอล (phenol)

ก่อนใช้ฟีนอลต้องปรับค่า pH ให้มากกว่า 7.8 เพราะดีเอ็นเอจะสามารถละลายได้ในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด โดยการทำให้อิ่มตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ 10XTE, pH 8.0 จนกว่าจะมี pH ตามต้องการ (ตรวจสอบด้วยกระดาษวัดค่า pH) แล้วเติม hydroxyquinoline ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% เพื่อป้องกันการออกซิไดซ์

5. การเตรียมสารละลายสำหรับการใช้เจลละลายที่อุณหภูมิต่ำ (Low melting agarose gel electrophoresis)

5.1 สารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ (3 M sodium acetate)

เตรียมสารละลายจำนวน 20 มล. โดยชั่งเกลือ $NaOAC.3H_2O$ จำนวน 8.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 16 มล. ปรับปริมาตรเป็น 20 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

6. การเตรียมสารละลายสำหรับการทรานสฟอร์มพาหะดีเอ็นเอ pGEX-2T เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101

6.1 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ (0.1 M $CaCl_2$)

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง $CaCl_2.2H_2O$ จำนวน 0.147 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มล. ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่ 4°ซ

6.2 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ (0.01 M $CaCl_2$)

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง $CaCl_2$ จำนวน 1.67 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ถ้าเป็น $CaCl_2.2H_2O$ ต้องชั่ง 1.47 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1,000 มล. เก็บที่ 4°ซ

6.3 สารละลาย IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) ($C_9H_{18}O_5S$ 0.025 mg/ml)

เตรียมสารละลายในขวดสีชาที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง IPTG ($C_9H_{18}O_5S$) จำนวน 0.025 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เติม stock IPTG ปริมาตร

100 ไมโครลิตร ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.025 ไมโครกรัม/มล.)

6.4 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ($C_{16}H_{18}N_3O_4SNa$ 50 mg/ml) (ในภาคผนวกที่ 4)

เตรียมสารละลายในขวดสีชาที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง ampicillin sodium จำนวน 50 มก. ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เติม stock ampicillin ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 50 ไมโครกรัม/มล.)

7. การเตรียมสารละลายสำหรับการสกัดพาหะดีเอ็นเอ pGEX-2T เพื่อนำไปใช้โดยวิธี minipreparation

7.1 สารละลายสกัดแอลคาไลน์ (alkaline extraction solution)

สารละลายที่ 1 : *Solution I* (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 5 mg/ml Lysozyme)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. ในหลอดปลอดเชื้อ โดยผสม

1 M Tris-HCl, pH 8.0	0.25	มล.
0.5 M EDTA	0.2	มล.
40% glucose	0.237	มล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	9.35	มล.
รวมปริมาตร	10	มล.

เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ เติม Lysozyme 5 มก./มล. เมื่อต้องการใช้ เก็บต่อได้ที่ -20°ซ หลังจากละลายแล้วใช้ได้เพียงครั้งเดียว

หรือเตรียมสารละลายในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยผสม

100 mM glucose	5	มล.
1 M Tris-HCl, pH8.0	0.25	มล.
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.2	มล.
เติม Lysozyme	50	มก.
TEN buffer	1	มล.

แบ่งเป็นส่วน ๆ ละ 0.5 มล. สามารถเก็บได้นานที่ -20°ซ หลังจากละลายแล้วใช้ได้เพียงครั้งเดียวเช่นเดียวกัน

สารละลายที่ 2 : *Solution II* (1 % SDS, 0.2 N NaOH)

เตรียมสารละลายจำนวน 15 มล. ในหลอดปลอดเชื้อ โดยผสม

10% SDS	1.5	มล.
10 M NaOH	0.3	มล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	13.2	มล.
รวมปริมาตร	15	มล.

เตรียมเมื่อต้องการจะใช้ (fresh preparation) สามารถเก็บได้ประมาณ 1 อาทิตย์ ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายที่ 3 : *Solution III* สารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์, pH 4.8 (3 M sodium acetate, pH 4.8)

เตรียมสารละลายจำนวน 20 มล. โดยชั่งเกลือ $NaOAC.3H_2O$ จำนวน 8.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 16 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 4.8 ด้วยสารละลายกรด glacial acetic acid แล้วปรับปริมาตรเป็น 20 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121^{0}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ

7.2 <u>สารละลายกลูโคส 100 มิลลิโมลาร์</u> (100mM glucose)

เตรียมสารละลายจำนวน 25 มล. โดยชั่ง glucose จำนวน 0.45 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มล. นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121^{0}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ

7.3 <u>สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล</u> (10 N NaOH)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่งเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิห้อง

7.4 <u>สารละลายคลอแรมฟีนิคอล</u> (chloramphenicol 25 mg/ml)

เตรียมสารละลายจำนวน 2 มล. โดยชั่ง chloramphenicol จำนวน 50 มก. ละลายใน absolute ethanol ปริมาตร 2 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20^{0}ซ

8. การเตรียมสารละลายสำหรับการทำ dephosphorylation พลาสมิด pGEX-2T ที่ตัดด้วย *Bam*HI

8.1 <u>สารละลาย Tris-HCl 0.01 โมลาร์, pH 8.0</u> (10 mM Tris-HCl, pH 8.0)

เตรียมสารละลายจำนวน 500 ไมโครลิตร โดยผสมสารละลาย 1 M Tris-HCl, pH 8.0 จำนวน 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 495 ไมโครลิตร

8.2 สารละลายบัฟเฟอร์ STE (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 10 mM EDTA)

เตรียมสารละลายจำนวน 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยผสม

1 M Tris-HCl, pH 8.0	50	ไมโครลิตร
5 M NaCl	100	ไมโครลิตร
0.5 M EDTA, pH 8.0	10	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	340	ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อมดีเอ็นเอ (Ligation)

9.1 สารละลาย ATP (10 mM adenosine triphosphate)

เตรียมสารละลายโดยชั่ง ATP จำนวน 6 มก. ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 0.8 มล. ปรับค่า pH เป็น 7.0 ด้วย 0.1 M NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 มล. ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แบ่งเป็นส่วน ๆ ละ 0.5 มล. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70°ซ

10. การเตรียมสารละลายสำหรับเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ให้อยู่ในรูปคอมพีเทนต์เซลล์

10.1 อาหาร L-Broth สำหรับทำทรานสฟอร์มด้วยกระแสไฟฟ้า (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ L-Broth จำนวน 100 มล. โดยชั่ง

bacto-tryptone	1.0	กรัม
bacto-yeast extract	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10.2 สารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (10% glycerol)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. โดยละลาย 100% glycerol (anhydrous) ปริมาตร 1 มล. ในน้ำกลั่น 10 มล. นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

11. การเตรียมสารละลายสำหรับการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ด้วยวิธี electroporation

11.1 skim milk plate

ก. ละลายนมผงพร่องมันเนยในน้ำกลั่น 10% (w/v) จำนวน 10 มล.

นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 110°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 8-10 นาที

ข. ละลาย bacto-agar ในน้ำกลั่น 1.5% (w/v) จำนวน 100 มล.

นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เติมนมพร่องมันเนยที่ปลอดเชื้อแล้ว 5 มล. (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5%) ลงในวุ้นที่อุ่นแทลงในจานใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

12. การเตรียมสารละลายสำหรับการตรวจวัดแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีเอสจากทรานสฟอร์แมนท์ ซึ่งอยู่ในรูป fusion protein

การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนไทโรซีน ความเข้มข้น 0- 140 ไมโครกรัมต่อมล.

เตรียม tyrosine stock solution เข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มล. (น้ำหนักโมเลกุล 181.19)

ความเข้มข้น (µg/ml)	stock (ml)	บัฟเฟอร์ (ml)
0	0	5
20	0.5	4.5
40	1.0	4.0
60	1.5	3.5
80	2.0	3.0
100	2.5	2.5
120	3.0	2.0
140	3.5	1.5

12.1 สารละลายโซเดียมซักซิเนต (0.1 g/ml)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง $(CH_2COONa)_2$ $6H_2O$ จำนวน 10 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล (Basal medium)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal broth จำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง

bacto-yeast extract	20	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.01	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เติมแหล่งคาร์บอน ดังนี้

- สารละลายโซเดียมซักซิเนต (0.1 กรัม/มล.) ที่แยกฆ่าเชื้อต่างหากให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% (เติมจำนวน 100 มล. ต่อ อาหาร 1 ลิตร)

12.3 สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 โมลาร์, pH 7.5 และ 8.0

ก. เตรียมสารละลาย 0.2 M Na_2HPO_4 (X) จำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง

Na_2HPO_4 $2H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 178.05)	35.61	กรัม/ลิตร หรือ
Na_2HPO_4 $12H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 358.22)	71.64	กรัม/ลิตร

ข. เตรียมสารละลาย 0.2 M NaH_2PO_4 (Y) จำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง

NaH_2PO_4 H_2O (น้ำหนักโมเลกุล 138.01)	27.6	กรัม/ลิตร หรือ
NaH_2PO_4 $2H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 178.05)	31.21	กรัม/ลิตร

แล้วผสมสารละลายในข้อ ก. และ ข. ดังกล่าวตามค่า pH ที่ต้องการ

pH, 25°ซ	X (ml)	Y (ml)
7.5	420	80
8.0	473.5	26.5

และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น

12.4 สารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์, pH 9.5, 10.0 และ 10.5

ก. เตรียมสารละลาย 0.2 M Na_2CO_3 (X) จำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง

$Na_2CO_3\ 10H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 286.2) 57.24 กรัม/ลิตร หรือ

Na_2CO_3 (น้ำหนักโมเลกุล 106.2) 21.2 กรัม/ลิตร

ข. เตรียมสารละลาย 0.2 M $NaHCO_3$ (Y) จำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง

$NaHCO_3$ (น้ำหนักโมเลกุล 84.0) 16.80 กรัม/ลิตร

แล้วผสมสารละลายในข้อ ก. และ ข. ดังกล่าวตามค่า pH ที่ต้องการ

pH, 20°ซ	X (ml)	Y (ml)
9.5	65	185
10.0	137	112.5
10.5	202.5	47.5

และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น

12.5 สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 โมลาร์, pH 7.0 , 8.5 และ 9.0

เตรียมสารละลายจำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง tris (hydroxymethyl)-aminomethane จำนวน 12.11 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่า pH ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น

12.6 สารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอเนต 0.1 โมลาร์, pH 11.0

เตรียมสารละลายจำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง Na_2CO_3 จำนวน 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล.ปรับค่า pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น

12.7 สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (0.5% casein)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง casein hammersten จำนวน 0.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มล. ใช้เครื่องกวนแม่เหล็กจะช่วยให้การละลายดีขึ้น อย่าใช้อุณหภูมิสูงเนื่องจากโปรตีนจะเสียสภาพ เมื่อละลายหมดเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

12.8 สารละลาย ไทรคลอโรอะซิติกแอซิด 10เปอร์เซ็นต์ (10% TCA)

เตรียมสารละลายจำนวน 1,000 มล. โดยชั่งไทรคลอโรอะซิติกแอซิด จำนวน 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

13. การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ของเบรดฟอร์ด (Bradford Assay)

13.1 Bradford stock solution

เอธานอล 95%	100	มล.
กรดฟอสฟอริก 85 %	200	มล.
สี coomassie brilliant blue G-250	350	มก.

13.2 Bradford working solution buffer

น้ำกลั่น	425	มล.
เอธานอล 95%	15	มล.
กรดฟอสฟอริก 85 %	30	มล.
Bradford stock solution	30	มล.

กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 สามารถเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องได้นานหลายอาทิตย์ แต่อาจต้องกรองอีกครั้งก่อนนำมาใช้

การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมล.

เตรียมสารละลาย BSA stock เข้มข้น 1 mg/ml

ความเข้มข้น (µg/ml)	stock (µl)	น้ำกลั่น (µl)
0	0	100
25	25	75
50	50	50
75	75	25
100	100	0

14. การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสโดย PMSF (phenyl methanesulphonyl fluoride)

14.1 สารละลาย PMSF 0.5 mM (PMSF 87.1 mg/ml)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล.โดยชั่ง PMSF (น้ำหนักโมเลกุล 174.2) 0.871 กรัม ละลายใน ไอโซโพรพานอลปริมาตร 10 มล. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นสารพิษในการชั่งควรสวมหน้ากาก

14.2 สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0 (0.5 M EDTA, pH 8.0)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง disodium ethylene diamine tetraacetate.$2H_2O$ จำนวน 18.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วย เกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 2 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. นำไปทำให้ปลอดเชื้อ และทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตาราง นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

15. การเตรียมสารละลายสำหรับการเตรียมตรึงดีเอ็นเอเป้าหมายกับเมมเบรน สำหรับโคโลนีไฮบริไดเซชัน

15.1 สารละลาย denaturing solution (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่งเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 2 กรัม และ เกลือโซเดียมคลอไรด์จำนวน 8.766 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ปลอดเชื้อ สามารถเก็บได้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง

15.2 สารละลาย neutralizing solution (1 M Tris-HCl, pH 7.6, 1.5 M NaCl)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่งเกลือโซเดียมคลอไรด์จำนวน 8.766 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยสารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 7.6 ปลอดเชื้อ สามารถเก็บได้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง

15.3 สารละลาย 20X SSC stock (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0)

เตรียมสารละลายจำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง

NaCl	175.32	กรัม
tri-sodium citrate	88.23	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ปรับ ปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มี เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง สามารถเจือจางเป็น 2X SSC ได้โดยให้น้ำ กลั่นปลอดเชื้อ

16. การเตรียมสารละลายสำหรับการติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี (labelling) การติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี [α ^{32}P] dATP (Amersham) กับดีเอ็นเอติดตามที่มียีนนิวทรัลโปรตีเอส

16.1 <u>สารละลายรีเอเจนท์ A</u> (10 mM triethylamide, 1 mM EDTA, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.7)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยผสม

9.8 M triethylamide (น้ำหนักโมเลกุล 101.2)	0.102	มล.
1 M Tris-HCl, pH 8.0	10	มล.
0.5 M EDTA, pH 8.0	0.2	มล.

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 7.7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง ปรับปริมาตรให้ เป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

16.2 <u>ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน</u> (kanamycin $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ H_2SO_4 10 mg/ml) (ในภาคผนวกที่ 4)

เตรียมสารละลายในขวดสีน้ำตาลที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง

kanamycin monosulfate	10	มก.
ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ	1	มล.

เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

เติม stock kanamycin ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 10 ไมโครกรัม/มล.)

17. การเตรียมสารละลายสำหรับการไฮบริไดซ์ดีเอ็นเอติดตาม ที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีเพื่อจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย

17.1 <u>สารละลาย 100 X Denhardt stock</u> (2% BSA, 2% ficoll, 2% PVP)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง

BSA	2	กรัม
ficoll 400	2	กรัม
polyvinyl pyrolidone	2	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มล. ผสมให้ละลายจนหมด เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

17.2 สารละลาย working solution (5X Denhardt, 5X SSC, 1% SDS)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. ในขวดปลอดนิวคลิเอส โดยผสม

100X Denhardt	5	มล.
20X SSC	25	มล.
25% SDS	4	มล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	66	มล.

เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

17.3 สารละลายดีเอ็นเอของ salmon sperm (salmon sperm DNA 10 mg/ml)

เตรียมสารละลายจำนวน 1 มล. โดยชั่ง salmon sperm DNA 10 มก. ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มล. เก็บที่ -20°ซ ก่อนใช้ต้องนำมาต้มที่อุณหภูมิ 95-100°ซ นาน 10 นาที เพื่อเป็นการทำลายสภาพดีเอ็นเอจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว

18. การเตรียมสารละลายสำหรับการล้างแผ่นเมมเบรน (washing)

18.1 สารละลาย washing solution (6X SSC, 0.5% SDS)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. ในขวดปลอดนิวคลิเอส โดยผสม

20X SSC	600	มล.
25% SDS	40	มล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	1,360	มล.

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

19. การทำให้โปรตีเอสบริสุทธิ์ โดยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

19.1 สารละลายบัฟเฟอร์ 1XPBS (phosphate-buffered saline) (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 (pH 7.3))

เตรียมสารละลายจำนวน 1,000 มล. โดยชั่ง

NaCl (น้ำหนักโมเลกุล 58.443)	8.1820	กรัม
KCl (น้ำหนักโมเลกุล 74.56)	0.2013	กรัม
Na_2HPO_4 (น้ำหนักโมเลกุล 141.96)	1.4196	กรัม
KH_2PO_4 (น้ำหนักโมเลกุล 136.09)	0.2450	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 800 มล. ปรับค่า pH เป็น 7.3 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

19.2 สารละลาย glutathione elution buffer (10 mM reduced glutathione ใน 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)

เตรียมสารละลาย 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) จำนวน 1,000 มล.โดยชั่ง tris-HCl จำนวน 6.057 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 800 มล. ปรับค่า pH เป็น 8.0 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ใช้ละลาย reduced glutathione (น้ำหนักโมเลกุล 307.3) จำนวน 3.073 กรัม แบ่งเป็นส่วน ๆ ละ 1-10 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ ไม่ควร freeze/thaw มากกว่า 5 ครั้ง

19.3 สารละลาย 20 % Triton X-100

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยละลาย Triton X-100 ปริมาตร 20 มล. ในสารละลาย 1X PBS ปริมาตร 100 มล.

19.4 สารละลายทรอมบิน (Thrombin solution) (น้ำหนักโมเลกุล 37 กิโลดาลตัน)

ละลาย thrombin 500 cleavage units ในสารละลาย 1X PBS ที่แช่เย็น 4 °ซ ปริมาตร 0.5 มล. โดยแกว่งเบา ๆ และควรเก็บเป็นส่วน ๆ ที่อุณหภูมิ-80 °ซ

1 cleavage unit สามารถย่อยฟิวชันโปรตีนที่ต้องการทดสอบปริมาณ 100 ไมโครกรัม (หรือ 10 unit ต่อฟิวชันโปรตีน 1 มล.) ได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 22°ซ ในสารละลาย glutathione elution buffer

1 cleavage unit เท่ากับ 0.2 NIH units โดยประมาณ

ทรอมบินมีค่าแอคติวิตีประมาณ 7,500 NIH units ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ฉะนั้นในการทดลองใช้ทรอมบิน 50 cleavage unit เท่ากับ 10 NIH units คิดเป็น 0.0013 มิลลิกรัม

20. การเตรียมสารละลายสำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

20.1 stock solutions

20.1.1 2 M Tris-HCl, pH 8.8

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง tris base จำนวน 24.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 8.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นช้า ๆ ประมาณ 4 มล. และปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ เป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

20.1.2 1 M Tris-HCl, pH 6.8

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง tris base จำนวน 12.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มล. ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นช้า ๆ

ประมาณ 8 มล. และปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ เป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

20.1.3 สารละลาย SDS 10 เปอร์เซ็นต์ (10% SDS)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยชั่ง SDS จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิห้อง

20.1.4 สารละลายกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ (50% glycerol)

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยผสม 100% glycerol (anhydrous) ปริมาตร 50 มล. ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล.

20.1.5 สารละลายบรอมฟีนอลบลู 1 เปอร์เซ็นต์ (1% bromphenol blue)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. โดยชั่ง bromphenol blue 100 มก. ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. ผสมจนละลายหมด กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no. 1

20.2 working solutions

20.2.1 สารละลาย A (acrylamide stock solution) : 30% (w/v) acrylamide, 0.8% (w/v) bis-acrylamide

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. ในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยชั่ง acrylamide จำนวน 29.2 กรัม และ bis-acrylamide จำนวน 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. ผสมจนละลายหมด สามารถเก็บได้หลายเดือนในตู้เย็น

หมายเหตุ ควรทำงานในตู้ดูดควันเนื่องจากเป็นสารพิษ

20.2.2 สารละลาย B (4X separating gel buffer) : 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยผสม

2 M Tris-HCl, pH 8.8	75	มล.
10% SDS	4	มล.
น้ำกลั่น	21	มล.

สามารถเก็บได้หลายเดือนในตู้เย็น

20.2.3 สารละลาย C (4X stacking gel buffer) : 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS

เตรียมสารละลายจำนวน 100 มล. โดยผสม

1 M Tris-HCl, pH 6.8	50	มล.

10% SDS	4	มล.
น้ำกลั่น	46	มล.

สามารถเก็บได้หลายเดือนในตู้เย็น

20.2.4 สารละลาย 10% ammonium persulfate

เตรียมสารละลายจำนวน 5 มล. โดยชั่ง ammonium pursulfate จำนวน 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. ผสมจนละลายหมด สามารถเก็บได้หลายเดือนในตู้เย็น

20.2.5 สารละลายบัฟเฟอร์ electrophoresis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS)

เตรียมสารละลายจำนวน 1 ลิตร โดยชั่ง

tris-base	3	กรัม
glycine	14.4	กรัม
SDS	10	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ผสมจนละลายหมด สามารถเก็บได้หลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง

20.2.6 สีย้อมเจล coomasssie gel stain

เตรียมสารละลายจำนวน 1 ลิตร โดยชั่ง coomassie blue R-250 จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มล. และ เมธานอลปริมาตร 450 มล. และกรดอะซิติกปริมาตร 100 มล. ผสมจนละลายหมด สามารถเก็บได้หลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง

20.2.7 สารละลาย coomasssie gel destain

เตรียมสารละลายจำนวน 1 ลิตร โดยผสม

เมธานอล	100	มล.
glacial acetic acid	100	มล.
น้ำกลั่น	800	มล.

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

20.3 เตรียม separating gel 12% และ stacking gel 5%

ใช้ Pasteur pipette ดูด separating gel 12% ไปใส่ในอุปกรณ์ SDS-PAGE Mini-PROTEAN® II ช้า ๆ และพยายามไม่ให้เกิดฟอง ปล่อยให้พอริเมอไรซ์ 30-60 นาที จากนั้นจึง

ค่อยเตรียม stacking gel 5% เพื่อเททับชั้นบน พร้อมกับเสียบหวี (comb) เพื่อให้เป็นช่องใส่ตัวอย่าง ปล่อยให้แข็งตัวประมาณ 30 นาที

ผสมสารละลายต่อไปนี้

	separating gel 12%	stacking gel 5%
สารละลาย A (ml)	4	0.67
สารละลาย B (ml)	2.5	-
สารละลาย C (ml)	-	1.0
น้ำกลั่น (ml)	3.5	2.3
10% APS (µl)	50	30
TEMED (µl)	5	5

20.4 สารละลายที่ใช้เตรียม sample

20.4.1 สารละลายบัฟเฟอร์ 5X sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% BPB)

เตรียมสารละลายจำนวน 10 มล. โดยผสม

1 M Tris-HCl, pH 6.8	0.6	มล.
50% glycerol	5	มล.
10% SDS	2	มล.
2-mercaptoethanol	0.5	มล.
1% bromphenol blue	1	มล.
น้ำกลั่น	0.9	มล.

สามารถเก็บได้หลายสัปดาห์ในตู้เย็น หรือ หลายเดือนที่ -20°ซ

20.5 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานเก็บเป็น stock ความเข้มข้น 10 มก./มล. โดยชั่งโปรตีนมาตรฐาน 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มล. เก็บที่ 4°ซ

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกัลยกร วงศ์กาฬสินธุ์ เกิดเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2515 ณ จังหวัดสกลนคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2537

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย