บทที่ 3

การเตรียมน้ำยา

น้ำยาที่ใช้เตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน (hemolysate)

- 0.85 NaCl

ละลาย sodium chloride 8.5 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. เมื่อละลายดีแล้ว ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

น้ำยาที่ใช้ทำ microcolumn chromatography

1. บัฟเฟอร์เอ : 0.2 M glycine - 0.01 % KCN

glycine	15	กรัม
KCN	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	มล.

สารละลายที่เตรียมได้มี pH 7.3 +/- 0.2 และมีออสโมลาริตี (osmolarity) เท่ากับ 198.50 +/- 3.02 มิลลิออสโมล

2. บัฟเฟอร์ บี : 0.2 M glycine - 0.01 % KCN - 0.005 M NaCl

NaCl	0.293	กรัม
เติมบัฟเฟอร์เอ ให้ครบ	1000	มล.

สารละลายที่เตรียมได้มี pH 7.5 +/- 0.2 และมีออสโมลาริตี 207.0 +/- 2.43 มิลลิออสโมล

3. บัฟเฟอร์ ซี : 0.2 M glycine - 0.01 % KCN - 0.2 M NaCl

NaCl	11.7	กรัม
เติมบัฟเฟอร์เอ ให้ครบ	1000	มล.

สารละลายที่เตรียมได้มี pH 7.5 +/- 0.1 และมีออสโมลาริตี 567.7 +/- 6.44 มิลลิออสโมล

4. การเตรียม DEAE-cellulose

ล้าง DEAE-cellulose จำนวน 100 กรัม ในบัฟเฟอร์เอ 300 มล. โดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนนาน 10 นาที ทำการล้าง 3 ครั้ง แล้วแช่ DEAE - cellulose ไว้ในบัฟเฟอร์เอ โดยใช้ปริมาตรเท่ากัน ถ้ายังไม่ได้ใช้ทันทีให้เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C

น้ำยาที่ใช้ทำ cellulose acetate electrophoresis

1. Tris - EDTA - borate buffer pH 8.6

Tris base	10.2	กรัม
EDTA (disodium salt)	0.6	กรัม
boric acid	0.32	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	มล.

2. ponceau S staining S (0.5 % W/V)

ponceau S	0.5	กรัม
trichloroacetic acid (V/V)	5	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มล.

3. destaining solution

5 % acetic acid (V/V)

4. clearing solution

methanol : glacial acetic acid = 4 : 1

น้ำยาที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ

1. 3% dextran in NSS

ละลาย dextran 30 กรัม และ sodium chloride 9 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 800 มล. เมื่อละลายดีแล้ว ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนครบ 1000 มล. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. lysis buffer pH 7.4

ละลาย ammonium chloride 6.63 กรัม, potassium carbonate 0.80 กรัม, 500 mM EDTA 16 มล. ในน้ำกลั่น ประมาณ 700 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 800 มล. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. SE buffer

ละลาย Na_2EDTA 9.306 กรัม, sodium chloride 4.383 กรัม ในน้ำกลั่น ประมาณ 800 ml จนละลายดีแล้ว ปรับ pH ให้ได้ 7.8 เติมน้ำกลั่นจนปริมาณครบ 1000 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. 20% SDS

ละลาย sodium dodecyl sulphate (SDS) 20 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

5. pronase E

ละลาย pronase E 10 มล. ในน้ำกลั่น 1 มล. เก็บที่ -20 °C

6. saturated sodium chloride

ละลาย sodium chloride 350.66 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มล. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมน้ำยาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

1. 10X *Taq* buffer

ส่วนใหญ่ 10X *Taq* buffer จะได้มาพร้อมกับการซื้อ *Taq* polymerase หรืออาจเตรียมขึ้นได้เอง โดยใช้สารประกอบดังนี้

500 mM KCl

100 mM Tris-Cl (pH 8.3)

15 mM $MgCl_2$

0.1 % gelatin

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2. 10X *Taq* buffer + 3.0 mM $MgCl_2$ (สำหรับ ASPCR)

เตรียมโดยใช้สารประกอบดังนี้

500 mM KCl

100 mM Tris-Cl (pH 8.3)

30 mM $MgCl_2$

0.1 % gelatin

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3. dNTPs mixture (deoxyribonucleotide triphosphase)

ละลาย dNTP แต่ละตัวโดยใช้น้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 50-100 mM จากนั้นให้ใช้ 0.05 M Tris-base ปรับค่า pH ของสารละลาย dNTP แต่ละตัวให้ได้ 7.0 โดยใช้ pH meter ในการตรวจเช็คเพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย dNTP แต่ละตัวให้แบ่งเอาสารละลาย dNTP ซึ่งปรับค่า pH แล้วทำให้เจือจาง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ความยาวคลื่นสำหรับ dNTP แต่ละตัวตามตารางด้านล่าง นำค่าการดูดแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยใช้สูตร

(path length ของ cuvette = 1 cm)

$$\text{Absorbance} = e \times M$$

เก็บสารละลาย dNTP แต่ละตัว ในปริมาตรน้อย ๆ เพียงพอที่จะนำออกมาใช้แต่ละครั้งที่ -20 °C หรือ -70 °C ค่าคงที่ทางกายภาพของ nucleotide triphosphates แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าคงที่ทางกายภาพของ nucleotide triphosphates

compound	M.W.	lambda Max (pH 7.0)	e Max (pH 7.0)	Absorbance Ratio (280/260)	pKa base
ATP	507.2	259	14.7	0.16	4.0
CTP	483.2	280	13.0	2.12	4.8
GTP	523.2	252	13.7	0.67	3.3
					9.3
UTP	484.2	262	10.0	0.38	9.5
dATP	491.2	259	15.2	0.15	3.6
dCTP	467.2	280	13.1	2.10	4.3
					2.3
dGTP	507.2	253	13.7	0.67	9.3
dTTP	482.2	267	9.6	0.73	9.3

1 กิโลเบส ของ ดีเอ็นเอ มีค่าประมาณ

=> 6.5x10**5 Dalton ของ duplex DNA (sodium salt)

=> 3.3x10**5 Dalton ของ single-stranded DNA (sodium salt)

=> 3.4x10**5 Dalton ของ single-stranded RNA (sodium salt)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. 50 % glycerol

ใช้ autopipette ดูด 100 % glycerol ช้า ๆ (เนื่องจาก 100 % glycerol มีความหนืดมาก) แล้วปล่อยลงไปในน้ำกลั่น 100 มล. อย่างช้า ๆ เช่นกัน จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย Vertex mixure เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมน้ำยาที่ใช้ทำ restriction analysis

1. 10X Ava II buffer

ส่วนใหญ่จะได้มาพร้อมกับการซื้อเอนไซม์ Ava II หรืออาจเตรียมขึ้นเองโดยใช้ส่วนประกอบดังนี้

100 mM Tris-Cl

50 mM $NaCl_2$

10 mM $MgCl_2$

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C

การเตรียมน้ำยาที่ใช้ทำ agarose gel electrophoresis

1. การเตรียม 1.2% agarose gel

ละลาย agarose 1 กรัม ใน 1X E buffer 100 มล. นำไปต้มประมาณ 5 นาที ให้เปลี่ยนสภาพเป็นเจล (ต้มให้ละลายเมื่อต้องการใช้ครั้งต่อไป)

2. TE buffer ประกอบด้วย

10 mM Tris acetate

1 mM EDTA

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. electrophoresis buffer (E-buffer) ประกอบด้วย

40 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

4. gel-loading (6X) ประกอบด้วย

   0.25 % bromophenol

   0.25 % xylene cyanol

   30 % glycerol in water

5. ethidium bromide (0.5 มก./มล.)

   ใส่สารละลาย ethidium bromide (5 มก./มล.) 20 มล. ลงในน้ำกลั่น ปริมาณ 200 มล. ผสมให้เข้ากัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย