รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

บุญเลิศ ผาสุก. 2524. เต่าทะเลและการอนุรักษ์. *วารสารประมง*. 34: 253-265.

บุญเลิศ ผาสุก. 2525. การทำฟาร์มเต่าทะเลที่ให้ประโยชน์ทั้งทางเศรษฐกิจและการอนุรักษ์ในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

บุญเลิศ ผาสุก. 2535. การเพาะเลี้ยงเต่าทะเลในประเทศไทย. *วารสารประมง*. 45: 717-741.

บุญเลิศ ผาสุก. 2535. การอนุรักษ์เต่าทะเลในประเทศไทย. *วารสารประมง*. 45: 807-820.

มหิดล, มหาวิทยาลัย. 2530. *การฝึกอบรมพันธุวิศวกรรม เรื่อง DNA Probe ในการตรวจสารพันธุกรรมวินิจฉัยเชื้อโรค&พาหะ*. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (อัดสำเนา).

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และ มนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. *ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

สมชาติ สุขวงศ์ และโกวิทย์ เก้าเอี้ยน. 2537. การเลี้ยงเต่าทะเลในกระชัง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2537 มกราคม 2537. สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งทะเลจังหวัดพังงา. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กรุงเทพฯ.

ศิริพร สิทธิประณีต. 2531. *พันธุวิศวกรรม: ปฏิบัติการเบื้องต้น*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ส.วิชาญการพิมพ์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Bickham, J. W. 1980. The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). *Copeia*. 3: 540-543.

Bjorndal, K.A.. 1982. *Biology and conservation of sea turtles.* Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press. pp.

Bull, J.J. 1980. Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology*. 55: 2-29.Bull, J.J. and Vogt, R.C. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtles. *The Journal of Experimental Zoology* 218: 435-440.

Bull, J.J., Vogt, R.C., and Bulmer, M.G. 1982. Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. *Evolution.* 36: 333-341.

Demas, S. 1990. Sex-specific DNA in reptiles with temperature sex determination. *The Journal of Experimental Zoology*. 253: 319-334.

Durbin, E. J., Erickson R. P. and Craig, A. 1989. Characterization of GATA /GACA-related sequences on proximal chromosome 17 of the mouse. *Chromosoma.* 97: 301-306.

Gutzke, W.H. 1983. Influence of the hydric enviromental on sexual differentiation of turtles. *The Journal of Experimental Zoology*. 226: 467-469.

Harata, M., Ouchi, K., Ohata, S., Kikuchi., A. and Mizuno, S. 1988. Purification and characterization of W-protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 263:13952-13961.

Harry, J. L. and Williams, K. I. 1991. Differential growth of male and female urinogenital systems of *Caretta caretta* within the sex determining period. *The Journal of Experimental Zoology*. 258: 204-211.

Husebye, H., Lund, S., Moller, M., Sunde, A. and Krokan, H. E.1994. A Bkm-relatedDNA sequence gives individual DNA fingerprints in turbot (*Scophthalmus maximus*), but neither Bkm-related, human SRY or human ZFY probe detect genetic sex differences. *Comparative Biochemical Physiology*. 107B: 69-73.

Janzen, F.J. 1988. Environmental sex determination in reptiles. *Nature*. 332: 790.

Janzen, F.J. 1991. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution and experimental design. *The Quarterly Review of Biology*. 66: 149-179.

Janzen, F.J., Packard, G.C., Packard, M.J., Boardman, T.J. and Zumbrunnen, J.R. 1990. Mobilization of lipid and protein by embryonic snapping turtles in wet and dry environments. *Journal of Experimental Zoology*. 255: 155-162.

Jones, K. W. and Singh, L. 1981. Conserved repeated DNA sequences in vertebrate sex chromosomes. *Human Genetics*. 58: 46-53.

Kunieda, T., Xian, M., Kobayashi, E., Imamichi, T., Moriwaki, K. and Toyoda, Y. 1992. Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromochom-specific sequence using polymerase chain reaction. *Biology of Reproduction.* 46 : 692-697.

Maniatis, T., Sambrook, J., and Fsitsch, E.F. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, USA.

Merchant-Larios, H. and Villal P.I. 1990. Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. *The Journal of Experimental Zoology*. 254: 327-331.

Morreale, S.J., Ruiz, G.J., Spotila, J.R. and Standora, E. A. 1982. Temperature-dependent sex determination: current practics threaten conservation of sea turtles. *Science*. 216: 1245-1247.

Natural resources marine research institute. Al/turtle.tamu.edu.html.(internet news)

Panicker, S. G.and Singh, L. 1994. Banded krait minor satellite (Bkm) contains sex and species-specific repetitive DNA. *Chromosoma.* 103: 40-45.

Ray - Chaudhuri, S. P., Singh, L. and Sharma, T. 1971. Evolution of sex-chromosomes and formation of W-chromatin in snakes. *Chromosoma (Berl.).* 33: 239-251.

Saiton, Y. and Mizuno, S. 1992. Distribution of *Xho*I&*Eco*RI family repetitive DNA sequences into separate domains in the chicken W-chromosome. *Chromosoma*. 101: 474-477.

Scott, P.P., Haymes, K.M. and Williams, S.M. 1992. Parentage analysis using RAPD-PCR. *Nucleic Acids Research*. 20:5493.

Sea world Education Department. 1994. Cl/htm/Internet/micro/seaturtle.html. (internet news)

Singh, L. 1972. Evolution of karyotypes in snakes. *Chromosoma (Berl.)*. 38:185-236.

Singh, L., Phillips, C. and Johnes K. W. 1984. The conserved nucleotide sequences of Bkm, Which define sex in the mouse, are transcribed. *Cell*. 36: 111-120.

Singh, L., Purdom, I. F. and Jones, K. W. 1976. Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*. 59: 43-62.

Singh, L., Purdom, I.F. and Jones, K.W. 1977. Effect of different denaturing agents on the detectability of specific DNA sequences of various base compositions by *in situ* hybridization. *Chromosoma (Berl.)*. 60: 377-389.

Singh, L., Purdom, I. F. and Jones, K. W. 1979. Behaviour of sex chromosome associated satellite DNAs in somatic and germ cells snakes. *Chromosoma (Berl.)*. 71: 167-181.

Singh, L., Purdom, I.F. and Jones, K.W. 1980. Sex chromosome associated satellite DNA evolution and conservation. *Chromosoma (Berl.)*. 97: 137-157.

Singh, L., Wadhwa, R., Naidu, S., Nagaraj, R. and Ganesan, M. 1994. Sex-and tissue-specific Bkm (GATA)-binding protein in the germ cells of heterogametic sex. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:25321-25327.

Spotila, J. R., Spotila, L. D. and Kaufer, N.F. 1994. Molecular mechanisms of TSD in reptiles: A search for the magic bullet. *The Journal of Experimental Zoology*. 270: 117-127.

Tiersch, T. R., Simco, B. A., Davis, K. B. and Wachtel, S. S. 1992. Molecular genetics of sex determination in channel catfish: studies on SRY, ZFY, Bkm, and human telomeric repeats. *Biology of Reproduction*. 47: 185-192.

Wibbels, T., Bull, J. J. and Crews, D. 1991. Chronology and morphology of temperature dependent sex determination. *The Journal of Experimental Zoology*. 260: 371-381.

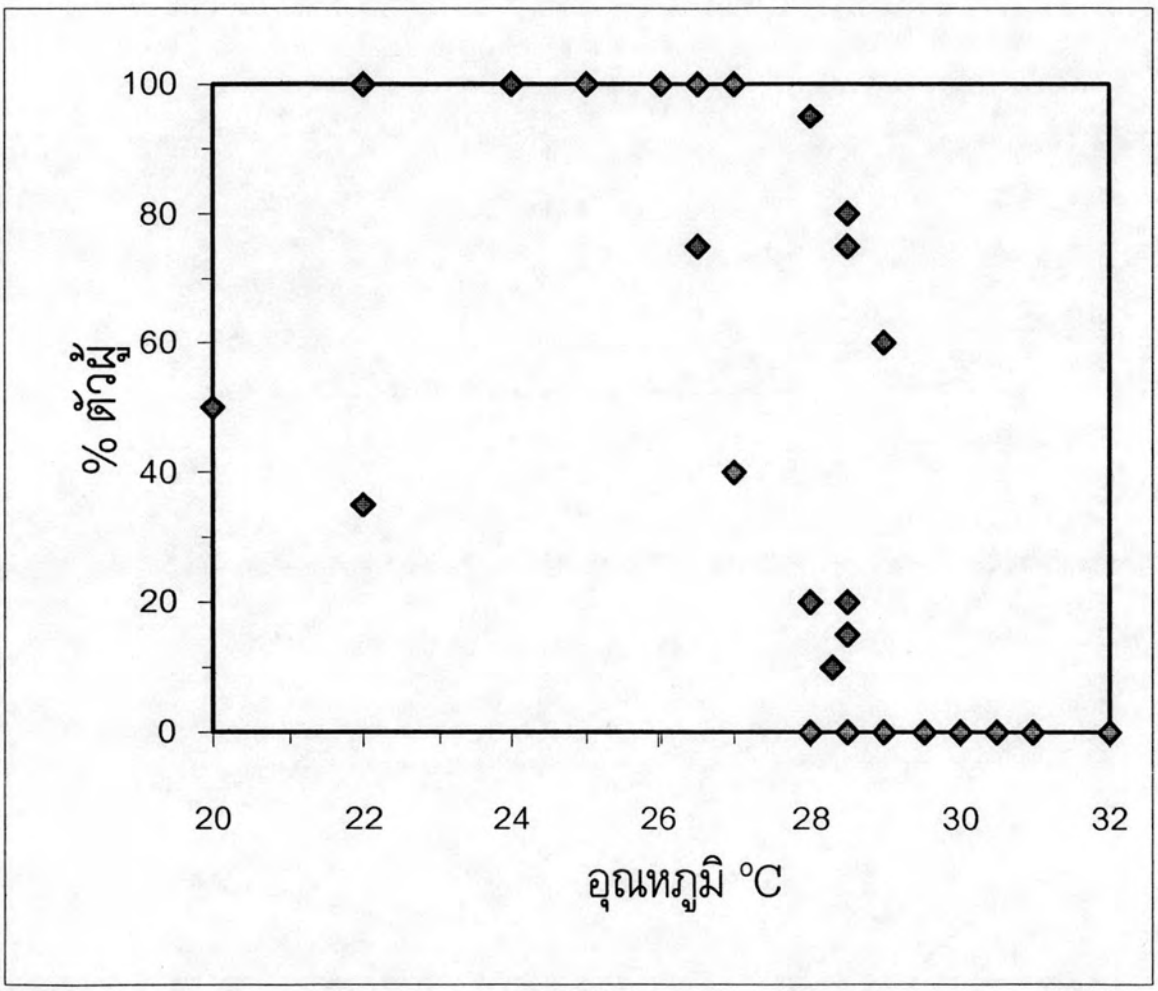
Williams, JG.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplify polymorphic DNA marker. *Method in Enzymology*. 218:704-708.

Wodhwa, R., Naidu, S., Nagaraj, R. and Ganesan, M. 1994. Sex and tissue-specific Bkm (GATA)-binding protein in the germ cell of heterozygametic sex. *Journal of Biological Chemical*. 269: 25321-25327.

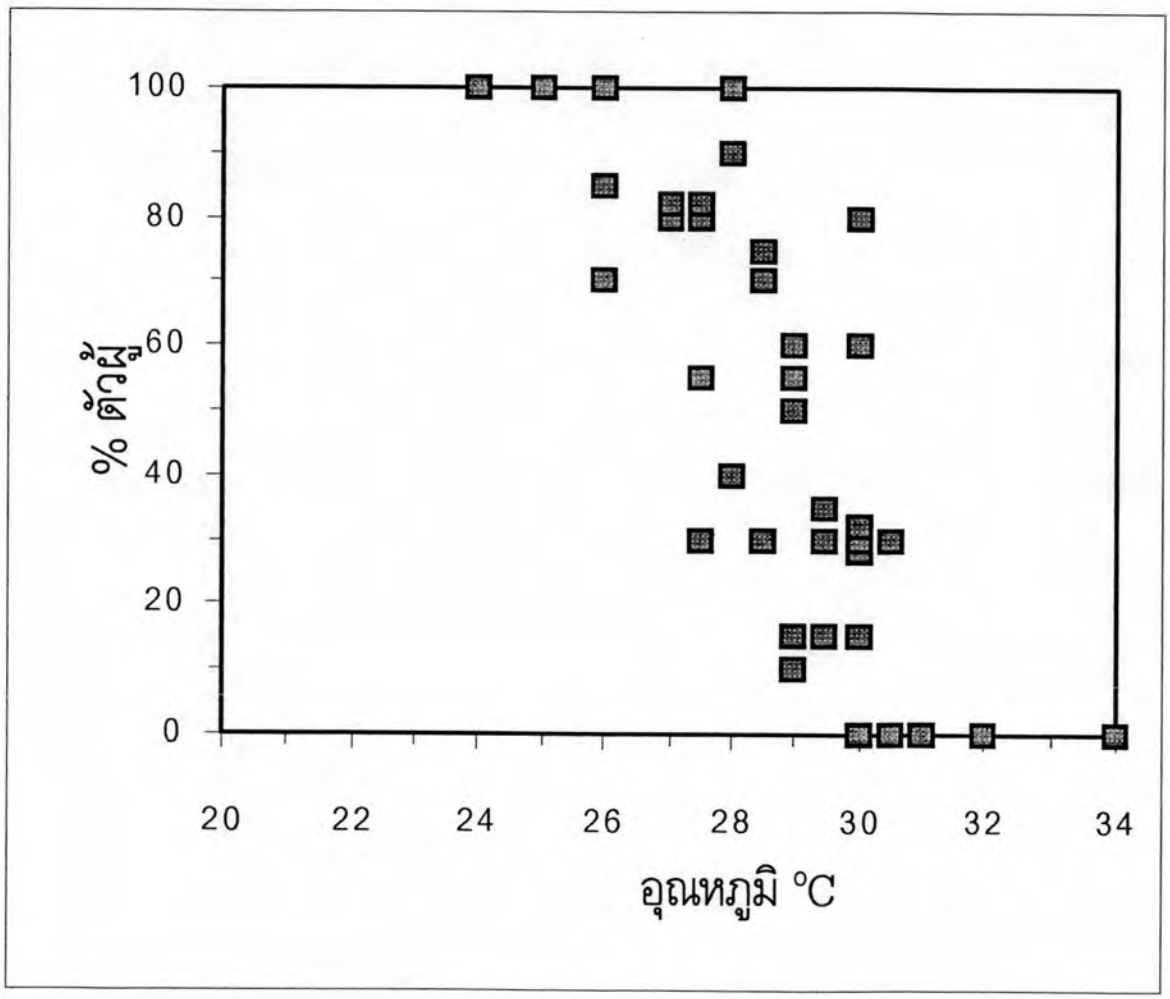
ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราส่วนระหว่างเพศในเต่า *Chrysemys picta*

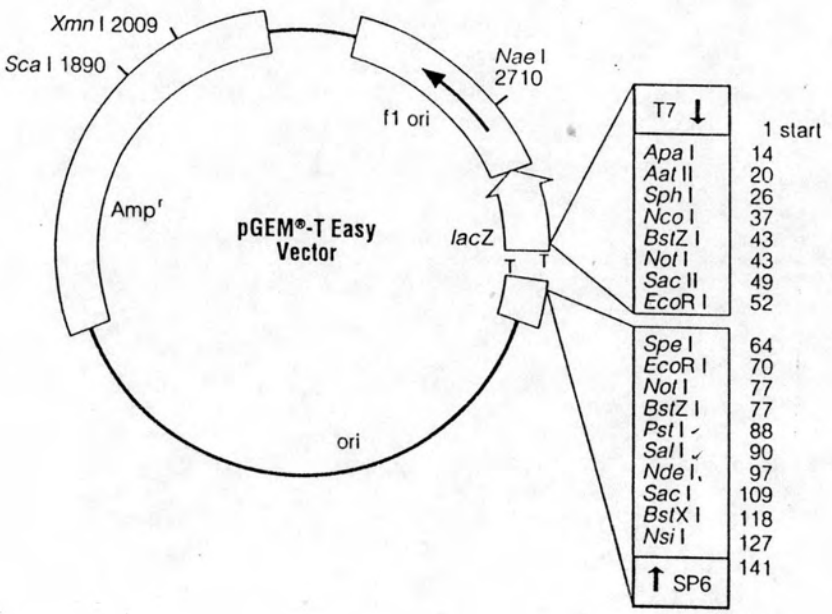
(Janzen,1990)



ภาคผนวกที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราส่วนระหว่างเพศในเต่า *Caretta caretta* (Janzen,1990)



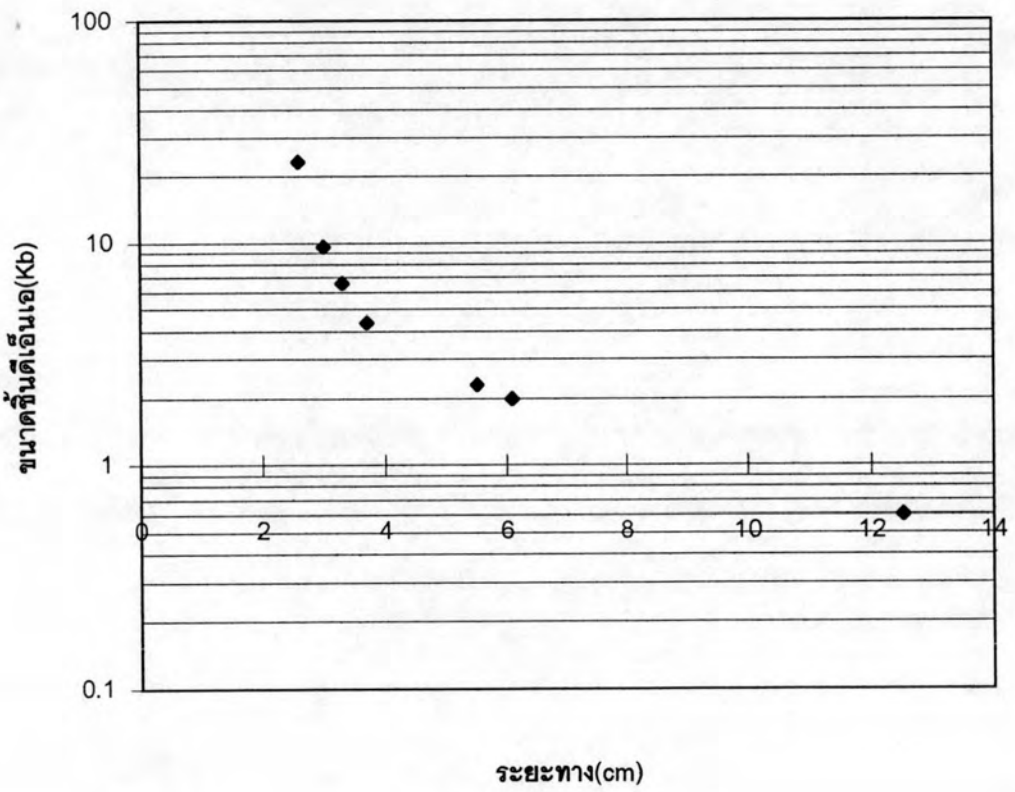
ภาคผนวกที่ 3 pGEM -T Easy vector circle map



ภาคผนวกที่ 4 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำ PCR

สาร	ปริมาตร (µl)	Final concentration	Optimum concentration
10 X PCR buffers	2.5	1X	1X
25 mM $MgCl_2$	2.5	2.0 mM	2.0 mM
10 mM dNTP	2	0.8 mM	0.7 - 0.8 mM
3 µM primer	4	0.48 µM	0.1 - 0.5 µM
100-500 ng/µl template DNA	1	100 - 500 ng	100 - 500 ng
5 U/µl Tag polymerase	0.125	0.025 U	-
dd H_2O	12.875	-	-
รวม	250	-	-

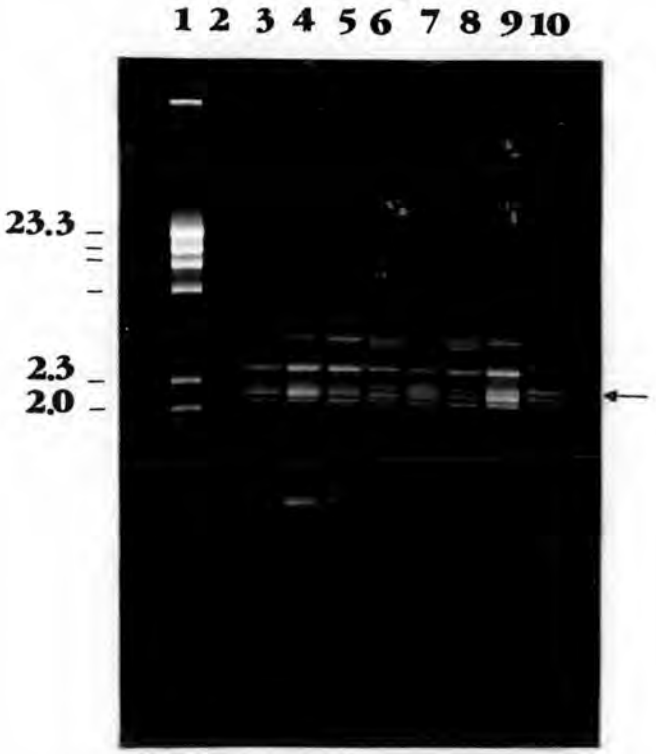
ภาคผนวกที่ 5 กราฟเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 49° ซ ของเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้วกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*d III ในอะกาโรสจลเข้มข้น 1.6% ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 120 โวลต์



ภาคผนวกที่ 6 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing ต่าง ๆ

	ตัวอย่างที่พบชิ้นดีเอ็นเอ					
อุณหภูมิ ขนาด(Kb)	53°C	51°C	49°C	47°C	45°C	43°C
3.76	-	-	-	-	ทุกตัว	-
3.53	-	-	-	F4	ทุกตัว	-
3.13	-	F3,F4	F3,F4	F3,F4	ทุกตัว	-
3.08	-	-	-	F4	-	-
2.50	-	ทุกตัว	-	F5	ทุกตัว	ทุกตัว
2.29	M3,F1-F5	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	M3,F1-F5	ทุกตัว
2.25	-	-	F5	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว
2.12	M3,F1-F5	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว
2.03	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	-	-
1.85	-	M3,F1	F1,F2	F5	-	-
1.65	-	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	-	-
1.35	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว
1.28	F3,F5	F3,F5	F3,F5	F3,F5	-	-
1.17	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	ทุกตัว	-	-
1.04	-	M1,F3	F3	-	-	-
1.00	-	-	M2,F1-F5	ทุกตัว	-	-
0.95	F3	ทุกตัว	M2,F1-F5	-	-	-
0.85	ทุกตัว	-	ทุกตัว	ทุกตัว	-	-
0.75	M3	M3,F1	M3,F1	M3,F1	-	-
0.70	M3	-	M3,F1	-	-	-
รวมจำนวน แถบที่พบ	10	13	16	16	8	5

<u>ภาคผนวกที่ 7</u> ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเต่าตนุที่ทราบเพศแล้วที่อุณหภูมิ annealing 45°C



ช่องที่ 1 - ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*d III

ช่องที่ 2 - negative control

ช่องที่ 3-5 - ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของเต่าตนุ เพศผู้รหัส M1-M3

ช่องที่ 6-10 - ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ของเต่าตนุเพศเมียรหัส F4-F8

⟶ - แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส

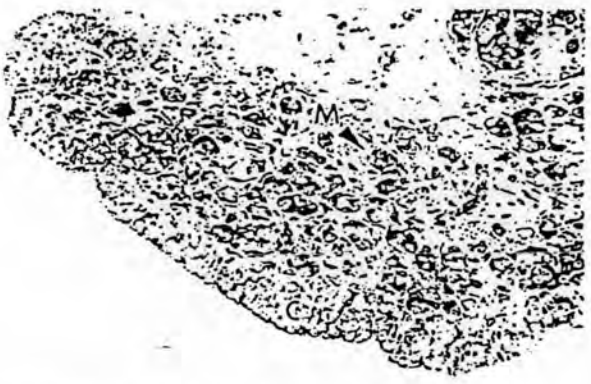
<u>หมายเหตุ</u> การทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 45°C ต้องการ DNA ที่มีคุณภาพสูงกว่าการทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 49°C จึงให้ผลไม่ดีนักในโครโมโซมัลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากลูกเต่าตนุ

<u>ภาคผนวกที่ 8</u> ลักษณะโกแนดของลูกเต่าหญ้า (Merchant-Larios และ Villalpando,1990)

ก

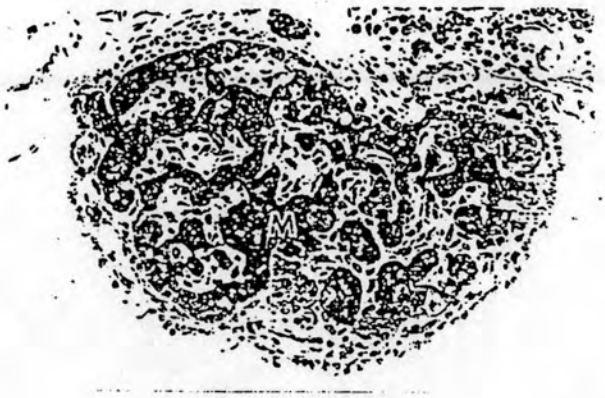
อัณฑะ (testis) ส่วนของคอร์เทกซ์เรียงตัวอยู่ที่ขอบ เมดัลลาเรียงตัวเป็นท่อขดไปมาชัดเจน

ข



รังไข่ (ovary) ส่วนของคอร์เทกซ์และเมดัลลาแยกกันโดยส่วนคอร์เทกซ์จัดเรียงตัวอยู่บริเวณขอบอวัยวะเป็นขอบหนาส่วนเมดัลลาจับตัวเป็นกลุ่มก้อน

ค



โกแนดที่ยังไม่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์ยังคงเป็นแบบ epithelial like cell ทั้งในส่วนเมดัลลา และ คอร์เทกซ์

<u>ภาคผนวกที่ 9</u> in situ hybridization ของงู *Naja naja naja* เพศเมีย

ก C-banded metaphase chromosome ข in situ hybridization of Bkm

ก

ข

ภาคผนวกที่ 10 การเตรียมสาร

สารละลาย acid citrate dextrose ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง กรดซิตริก 0.48 กรัม โซเดียมซิเตท 1.32 กรัม กลูโคส 1.47 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อและนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์ ที่ pH ต่างๆ คือ 7.6, 7.7, 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง Tris (hydroxymethyl)-aminomethane 12.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่าpH ให้ได้ดังต้องการด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0 (0.5 M EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง EDTA จำนวน 18.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วย 10 N NaOH ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 20 และ 25% SDS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยชั่ง SDS จำนวน 20 และ 25 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร อุ่นที่ 68°ซ ปรับค่า pH เป็น 7.2 โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นทีละหยด ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม extraction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M EDTA และ 0.5%SDS) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

เตรียมโดยผสมสารต่างๆ ในปริมาณดังนี้ 1.0 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 20% SDS ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 432.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ไว้ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ที่ 4°ซ

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

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอสโดยผสม 1 M Tris-HCl, pH 7.6 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร 5 M NaCl ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9.86 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายโปรเนส (pronase 10 mg/ml ใน TEN buffer) จำนวน 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยชั่งเอนไซม์โปรเนสจำนวน 20 มิลลิกรัม ละลายใน TEN buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ก่อนใช้ทุกครั้งต้องอุ่นที่ 37 °C นาน 15 นาที สามารถเก็บได้นานที่ -20 °C

สารละลายบัฟเฟอร์อาร์เอนเอส (RNase buffer) (0.1 M sodium acetate pH 7.4, 0.3 mM EDTA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอสโดยผสม 1 M sodium acetate, pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายอาร์เอ็นเอส (pancreatic ribonuclease A 10 mg/ml ใน RNase buffer) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยชั่ง Pancreatic Ribonuclease A จำนวน 10 มิลลิกรัม ละลายใน RNase buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนใช้ทุกครั้งต้องต้มที่ 80 °C นาน 10 นาที สามารถเก็บได้นานที่ -20 °C

สารละลายโซเดียมอะซิเตท 1 โมลาร์, pH 7.4 (1 M sodium acetate,pH 7.4) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเตท จำนวน 13.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7.4 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

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

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปลอดนิวคลิเอส โดยผสม 1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10.0 มิลลิลิตร หรือเตรียมเป็น 10X TE buffer 1 ลิตร โดยชั่ง Tris(hydroxymethyl)-aminomethane 12.11 กรัม Na_2EDTA 3.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจาง 10 เท่าก่อนใช้

สารละลายฟีนอล (phenol)

ปรับค่า pH ของสารละลายฟีนอล ให้มากกว่า 7.8 โดยทำให้อิ่มตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ 10XTE, pH 8.0 จนกว่าจะมี pH ตามต้องการ (ตรวจสอบด้วยกระดาษวัดค่า pH) แล้วเติม hydroxyquinoline ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% เพื่อป้องกันการออกซิไดซ์

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ (5 M NaCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์จำนวน 29.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ (0.7% agarose)

เตรียมโดยชั่งอะกาโรสเจลจำนวน 0.7 กรัม ละลายใน TB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดและคนจนละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50 °C จึงเทเจลลงในเจล-แชมเบอร์ปล่อยให้เจล แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate buffer (1X TB buffer : 8.9 mM Tris-HCl, 8.9 mM boric acid, 0.25 mM EDTA, pH 8.3) ปริมาตร 1 ลิตร

-เตรียม 10X TB buffer โดยชั่ง Tris (hydroxymethyl)-aminomethane 108 กรัม กรดบอริก 55 กรัม Na_2EDTA 0.93 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจางแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1

ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการใช้จึงเจือจางให้เป็น 1X TB โดยผสม 10X TB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 900 มิลลิลิตร

สารละลายสี tracking dye (0.025% bromphenol blue, 40% ficoll 400, 0.1% SDS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง bromphenol blue จำนวน 2.5 มิลลิกรัม ficoll 400 จำนวน 4 กรัม SDS จำนวน 50 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายจนหมด

*หมายเหตุ ใช้ tracking dye ปริมาตร 1 ใน 5 ของส่วนผสมที่เกิดปฏิกิริยา (reaction mixture)

สารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide 2.5 μg/ml)

เตรียมโดยชั่งสารเอทิเดียมโบรไมด์ จำนวน 2.5 มิลลิลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

สารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ (3 M sodium acetate) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเตท จำนวน 8.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 16 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker)

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองคือดีเอ็นเอของแลมดาฟาจ (λ-DNA) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III อย่างสมบูรณ์โดยย่อย λ-DNA เข้มข้น 0.524 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ย่อยด้วย *Hind* III จำนวน 10 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน เจือจางด้วย TE buffer เติมสี tracking dye เพื่อใช้เป็นตัวติดตามการเคลื่อนที่ ตรวจคุณภาพด้วยการทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส λ/*Hind* III maker ที่เตรียมสมบูรณ์จะมีชิ้นดีเอ็นเอ 8 ขนาด คือ 23.136, 9.146, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564 และ 0.125 กิโลเบส ตามลำดับ

สี Eosin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งสีอีโอซินจำนวน 0.5 กรัม ละลายในเอทานอล 95 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้สีละลาย ใส่ไว้ในขวดที่ปิดฝาได้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สี Ehrlich 's acid heamatoxylin

เตรียมสารละลาย A และ B ดังนี้

สารละลาย A : ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยชั่งสีฮีมาโทไซลิน จำนวน 8 กรัม ละลายในแอบโซลูท-เอทานอล ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

สารละลาย B : ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยชั่งอะลูมิเนียมอลั่มจำนวน 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกันแล้วเติม glycerin ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก เข้มข้นจำนวน 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ถูกแสงอย่างน้อย 6 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

Differentiator (0.5 % HCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียม differentiator โดยดูดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับแอบโซลูทเอทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดที่ปิดฝาได้สนิทที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย denaturing (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 2 กรัม และโซเดียมคลอไรด์จำนวน 8.766 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

สารละลาย neutralizing (1 M Tris-HCl, pH 7.6, 1.5 M NaCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์จำนวน 8.766 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 7.6 ปลอดเชื้อ

สารละลาย 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) ปริมาตร 1 ลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์จำนวน 175.32 กรัม และไตรโซเดียมซิเตทจำนวน 88.23 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman 3MM เก็บที่อุณหภูมิห้อง สามารถเจือจางเป็น 2X SSC ได้โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

สารละลายรีเอเจนท์ A (10 mM triethylamide, 1 mM EDTA, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.7) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารโดยผสม 9.8 M triethylamide ปริมาตร 0.102 มิลลิลิตร 1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7.7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เจือจาง ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 100 X Denhardt stock (2% BSA, 2% ficoll, 2% PVP) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโดยชั่ง BSA จำนวน 2 กรัม ficoll 400 จำนวน 2 กรัม polyvinyl pyrolidone จำนวน 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายจนหมด เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

สารละลาย working solution (5X Denhardt, 5X SSC, 1% SDS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายในขวดปลอดนิวคลิเอส โดยผสม 100X Denhardt ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 20X SSC ปริมาตร 25 มิลลิลิตร 25% SDS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 66 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

สารละลายดีเอ็นเอของ salmon sperm (salmon sperm DNA 10 mg/ml) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง salmon sperm DNA จำนวน 10 มิลลิลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 °C ก่อนใช้ต้องนำมาต้มที่อุณหภูมิ 95-100 °C นาน 10 นาที เพื่อเป็นการทำลายสภาพดีเอ็นเอจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว

สารละลาย washing solution (6X SSC, 0.5% SDS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายในขวดปลอดนิวคลิเอสโดยผสม 20X SSC ปริมาตร 600 มิลลิลิตร 25% SDS ปริมาตร 40 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1,360 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani medium) (1% bacto-tryptone , 0.5% bacto-yeast extract , 1% NaCl, pH 7.5)

-อาหารเหลว (LB broth)

เตรียมโดยชั่ง bacto-tryptone จำนวน 1.0 กรัม bacto-yeast extract จำนวน 0.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์จำนวน 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ให้เป็น 7.5 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

-อาหารแข็ง (LB agar)

เตรียมโดยชั่งวุ้น (bacto-agar) จำนวน 1.5 กรัม (1.5% w/v) ละลายในอาหารเหลว (LB broth) 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ปล่อยให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50 °C จึงเทลงในจานเลี้ยงเชื้อเป็น agar plate ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ปล่อยให้อาหารแข็งตัวแล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

อาหาร L-Broth (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.5) xib,k9i 100 มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ L-Broth. โดยชั่ง bacto-tryptone จำนวน 1.0 กรัม bacto-yeast extract จำนวน 0.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์จำนวน 5.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย IPTG ($C_9H_{18}O_5S$ 0.025 mg/ml)

เตรียมสารละลายในขวดสีชาที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง IPTG จำนวน 0.025 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เติม stock IPTG ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.025 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

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

เตรียมสารละลายในขวดสีชาที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง ampicillin จำนวน 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เติม stock ampicillin ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ (0.1 M $CaCl_2$) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง $CaCl_2.2H_2O$ จำนวน 0.147 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 °C

สารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (10% glycerol) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลาย 100% glycerol (anhydrous) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ (0.01 M $CaCl_2$) ปริมาตร 1 ลิตร

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ โดยชั่ง $CaCl_2$ จำนวน 1.67 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ถ้าเป็น $CaCl_2.2H_2O$ ชั่ง 1.47 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 ลิตร เก็บที่ 4 °C

สารละลายกลูโคส 40 เปอร์เซนต์ (10% glucose) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง glucose จำนวน 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 5 mg/ml Lysozyme) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายในหลอดปลอดเชื้อโดยผสม 1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร 40% glucoseปริมาตร 0.237 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9.35 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เติม lysozyme 5 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้

Solution II (1 % SDS, 0.2 N NaOH) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายในหลอดปลอดเชื้อโดยผสม 10% SDS 1.5 มิลลิลิตร 10 M NaOH 0.3 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 13.2 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 15.0 มิลลิลิตร เตรียมเมื่อต้องการจะใช้ (fresh preparation)

Solution III (3 M sodium acetate, pH 4.8) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเตทจำนวน 8.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 16 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 4.8 ด้วยกรดอะซิติกแล้วปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อและทำลายนิวคลิเอสโดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

Bouin's fluid

เตรียมโดยผสมสารต่างๆ ในปริมาณ ดังนี้ กรดไพริกที่อิ่มตัวด้วยน้ำ 45 มิลลิลิตร ฟอร์มาลิน 25 มิลลิลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียน

นางสาวรุ่งนภา ผาสุข เกิดวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2515 ที่จังหวัดตราด สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตภาคใต้ เมื่อปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2537