ภาคผนวก

การเตรียมbuffer และสารละลายต่างๆ

1. Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) ของบริษัท Qiagen

   stock solution Qiagen 100 mM

   100 mM deoxyadenosine triphosphate (dATP)

   100 mM deoxycytidine triphosphate (dCTP)

   100 mM deoxyguanosine triphosphate (dGTP)

   100 mM deoxythymidine triphosphate(dTTP)

   เตรียม 10 mM จาก 100 mM dATP, dCTP, dTTP และ dGTP อย่างละ 1 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ไมโครลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส)

2. Loading dye ประกอบด้วย

Urea	2.4 กรัม
Sucrose	5 กรัม

   Bromphenol blue 1 มิลิตร จาก 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของ stock (0.5 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร)

   Xylene cyanol 1 มิลลิลิตร จาก 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของ stock (0.5 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร)

   0.5 EDTA 2 มิลลิลิตร

   น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

   ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 10 มิลลิลิตร

3. Marker λDNA digested with *Hind* III

λDNA	30 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	56 ไมโครลิตร
10x Buffer (promega)	10 ไมโครลิตร
Hind III (promega)	4 ไมโครลิตร

   นำส่วนผสมทั้งหมด incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมงจากนั้นเติม loding dye 20 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

4. 0.5 M EDTA

ชั่ง Disodium ethylinedinamide tetraacetate .$2H_2O$ 136.1 g ในน้ำ 800 ml กวนด้วย Magnetic stirrer เติมเกร็ด NaOH ลงไปจนกระทั่งได้ pH 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA จะละลายหมดพอดี จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 และ นึ่งฆ่าเชื้อ

5. Ethidium bromide (10mg/ml)

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายน้ำ 100 ml กวนด้วยการใช้ Magnetic stirrer จนกว่าจะละลาย(ให้หมดหลายชั่วโมง)ห่อด้วย Foil หรือ เก็บใส่ขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง

6. 20% SDS

ละลาย SDS 20 g ในน้ำกลั่นที่ sterile แล้ว 100ml อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อนช่อยให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

7. 20 XSSC

ละลาย Sodium chloride 175.3 g และ Sodium citrate 88.2 g ในน้ำ 800 ml จนละลายหมด จากนั้นปรับให้ pH 7.0 ด้วย 1.0 N NaOH และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นและนึ่งฆ่าเชื้อ

8. 1 M Tris –HCl

ละลาย Tris-base 121.0 g ในน้ำ 800 ml ปรับ pH โดยการใช้กรด HCl เข้มข้นจนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการ(pH 7-8) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ml sterile ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ

9. 10X TBE

108 g Tris base

55 g boric acid

40 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ละลาย Tris-base และ boric acid บน heated stir plate หมุนด้วย magnetic bar จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อ

10. TE buffer

1M Tis pH8.0	5 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	

ผสม 1 M Tris pH 8.0 5 มิลลิลิตร และ 0.5 EDTA 1 มิลลิลิตรให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร และทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

11. สารละลาย 2 % CTAB buffer ประกอบด้วย

1 M Tris pH 8.0	50 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	20 มิลลิลิตร
NcCl	40.88 กรัม

ผสม 1M Tris pH 8.0 50 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA pH 8.0 20 มิลลิลิตร ให้เข้ากันแล้วเติม NaCl 40.88 กรัม ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นเป็นปริมาตร 450 มิลลิลิตร และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ

12. EM-1 buffer ประกอบด้วย

-2 M Tris – HCl pH 7.0

- 5 เปอร์เซ็นต์ (sodium dodecyl sulfate)
- 0.1 M EDTA (ethylenediamine tetraacetate)
- MCE (mercaptoethanol)

13. TKM buffer

- 10.0 mM Tris
- 10.0 mM KCl
- 0.1 mM $MgCl_2$

14. STE buffer

- 1.0 M NaCl
- 0.50 M Tris –HCl
- 10 mM EDTA pH 7.2

15. stock solution for 5 % gel

Stock A :	Acrylamide	30.0 g
	Bisacrylamide	0.75 g
	Distilled water	100 ml
Stock B :	Tetramethylethylenediamine (TEMED)	
	2 ml in distilled water	
Stock C :	Tris	120 mM
	Sodium acetate 3 H_2O	60 mM
	Sodium EDTA	3 mM

Gel 1(nondenature gel)

distilled water	12 ml
stock C	10 ml
stock B	2.4 ml

ผสมในบีกเกอร์ ที่ 1

Stock A	5 ml
Ammonium persulfate	0.48 ml

ผสมในบีกเกอร์ที่2

จากนั้นนำเอาบีกเกอร์ที่1 และบีกเกอร์ที่ 2 ผสมกันเทลงในแบบเจลที่เตรียมไว้

Gel2 (denature gel)

Urea	14.4 g
Distilled water	7 ml
10XTBE –buffer pH 8.5	3.0 ml
stock A	5.0 ml

ผสมในบีกเกอร์ที่ 1 (ปั่นให้ใสไม่มีตะกอนแขวนลอยอยู่ในบิกเกอร์ 1)

Stock B	2.5 ml
10 เปอร์เซ็นต์	0.5 ml

ผสมในบีกเกอร์ที่2 จากนั้นไปผสมกับบีกเกอร์ที่ 1นำไปเทลงบนแบบเจล

15. Glycerol (60 เปอร์เซนต์) 100 ml

Glycerol (99 เปอร์เซ็นต์)	60 ml
Distilled water	40 ml

นึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้

16. MT-dyes(migration tracking dyes)

Bromphenol blue	0.3 เปอร์เซ็นต์
Xylene cyanol	0.6 เปอร์เซ็นต์

เตรียมใช้โดย

ชั่ง bromophenol blue 0.03 g และ xylene cyanol 0.6 ผสมกับ distilled water 3.94 ml และ glycerol 60 เปอร์เซ็นต์ (เตรียม 10 ml)

17. Developer

เตรียมปริมาตร 1,000 ml

Na_2CO_3	30 g
Formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์	1.5 ml
$Na_2S_2O_3$ (10 mg/ml)	200 ml

18. Sliver nitrate

เตรียมปริมาตร 1,000 ml

Sliver nitrate	1g
Formaldehyde	1.5 ml
Distilled water	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายเมธาสิทธิ์ คนการ
วัน เดือน ปี เกิด	เกิด 27 กุมภาพันธ์ 2519
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนปงพัฒนาวิทยาคม จ.พะเยา ปีการศึกษา 2534
	สำเร็จการศึกษามัธยมตอนปลายปีที่ 6 โรงเรียนปงรัชดาภิเษก จ.พะเยา ปีการศึกษา 2537
	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต(ชีววิทยาประยุกต์) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541
ทุนการศึกษา	ทุนอุดหนุนงานวิจัยบัณฑิตวิทยาลัย ปีการศึกษา 2541
	Teaching Assistant Scholarship ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2542
ที่อยู่	65 หมู่3 ตำบลออย อำเภอปง จังหวัดพะเยา 56140 โทร 01-7163877

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University