

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Chiang Mai University

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก.

## ก.1 Iscove 's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

Iscove 's Modified Dulbecco's Medium	17.7 กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	3.024 กรัม
Penicillin G	100 unit/ มล.
Gentamycin	100 $\mu$ l

ละลาย IMDM 17.7 กรัมและ NaHCO<sub>3</sub> 3.024 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH = 7.4 ด้วย NaOH 1 N เติม Penicillin G และ Gentamycin จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองสารละลายด้วย filter membrane ขนาดรู 0.2 ไมครอน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มม. ใช้กรวย filtration assembly ที่ประกอบเข้ากับ Side-arm flask ขนาด 1 ลิตร กรองโดยอาศัยเครื่อง Vacuum ภายในตู้ปลอดเชื้อ

## ก.2 10 % Fetal Calf Serum (FCS)

นำ Fetal Calf Serum แห้งลงในอ่างน้ำร้อน ที่ 56 °ซ 30 นาที แล้วแบ่งออกเป็น ส่วน ส่วนละ 10 มล. เก็บไว้ที่ -20 °ซ เพื่อนำไปใช้ต่อไป

10 % FCS ใน IMDM ประกอบด้วย FCS 10 มล. เติม IMDM 90 มล. ภายในสภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บใน 4 °ซ ก่อนใช้งานอุ่นที่ 37 °ซ

## ก.3 สารละลาย HAT (hypoxanthine, aminopterin และ thymidine) (x 100) (GIBCOBRRL, Cat. no. 10270-023)

นำ HAT (x100) 1 มล. เติม 10 % FCS ใน IMDM 99 มล. ภายในสภาพปลอดเชื้อเก็บที่ 4 °ซ ก่อนใช้งานอุ่นที่ 37 °ซ

## ก.4 สารละลาย HT (hypoxanthine และ thymidine)

สารละลาย HT ความเข้มข้น 100 เท่า (x 100) ประกอบด้วย hypoxanthine (x100) 13.6 มก. ละลายใน IMDM 8 มล. ค่อยๆเติม 1 N NaOH จนกระทั่ง hypoxanthine ละลายหมด จึงเติม thymidine (x 100) 7.6 มก. แล้วปรับ pH = 9.5 ด้วยกรดอะซิติก นำไปกรองด้วย filter membrane (0.2 ไมครอน) ภายในสภาพปลอดเชื้อ

นำสารละลาย HT (x 100) 1 มล. เติม 10 % FCS ใน IMDM 99 มล. ภายในสภาพปลอดเชื้อ เก็บที่ -20 °ซ ก่อนใช้งานอุ่นที่ 37 °ซ

**ก.5 สารละลายที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์ (Fusion solution)**

สารละลาย 50 % Polyethylene glycol (PEG) ประกอบด้วย Polyethylene glycol (Sigma , P3640) มวลโมเลกุล 3,350 ปริมาณ 2 กรัม เติม IMDM 2 มล. แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (autoclave)

สารละลาย 7.5 % dimethyl sulfoxide ประกอบด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO , Merck, Art. 802912) 7.5 มล. เติม IMDM ให้ได้ปริมาตรครบ 100 มล.

fusion solution ประกอบด้วย อัตราส่วน 50 % PEG : 7.5 % DMSO = 1 : 2

**ก.6 2-Mercaptoethanol (2-ME) (Sigma, M6250) (Davis and Hamilton, 1995)**

สารละลาย 2-ME (x1000) 0.035 มล. เติม IMDM ให้ปริมาตรครบ 10 มล. ( $5 \times 10^{-5} M$ ) เก็บไว้ที่  $4^{\circ}C$

นำสารละลาย 2-ME (X1000) 1 มล. เติมใน IMDM 1 ลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

**ก.7 สารละลาย Coating Buffer (Carbonate/Bicarbonate Buffer (0.05M)), pH = 9.6**

$Na_2CO_3$	4.29 กรัม
$NaHCO_3$	2.93 กรัม
Thimerosal	0.20 กรัม

เติมน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH = 9.6 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บที่  $4^{\circ}C$

**ก.8 Phosphate Buffer Saline (PBS) pH = 7.4**

NaCl	8.0 กรัม
$KH_2PO_4$	0.2 กรัม
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.8 กรัม
KCL	0.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH = 7.4 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCL เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1000 มล.

**ก.9 PBS-Tween Buffer (Washing Buffer)**

Polyethylenesorbitan monolaurate (Tween 80) 500 ไมโครลิตร เติม PBS ให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร คนให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

**ก.10 สารละลาย 3 % BSA**

ละลาย Bovine serum albumin - 3 กรัม ใน coating buffer 100 มล. เตรียมเมื่อต้องการใช้งาน

**ก.11 Citrate-Phosphate buffer pH=5.0**

Citric acid (monohydrate) 10.30 กรัม

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  18.16 กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH = 5.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCL เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1000 มล.

**ก.12 สารละลายหยุดปฏิกิริยา (Stopping solution)**

4 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ประกอบด้วยเติม  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%) 21.36 มล. ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

**ก.13 สารละลาย 1 % เจลาติน (1 % gelatine)**

ละลายเจลาติน 1 กรัม ใน coating buffer 100 มล. เตรียมเมื่อต้องการใช้งาน

**ก.14 สารละลายสำหรับ thiophilic resin chromatography**

สารละลาย ก.

Tris-HCL 12 กรัม

$\text{K}_2\text{SO}_4$  87 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH เป็น 7.6 ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

สารละลาย ข.

Tris-HCL 12 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH เป็น 7.6 ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

## ภาคผนวก ข.

ตารางที่ ข.1. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ในการหา intra และ inter coefficient assay

ค่าดูดกลืนแสง			ค่าดูดกลืนแสง			ค่าดูดกลืนแสง		
เพลทที่	ค่าที่อ่านได้	ค่าที่ปรับแล้ว	เพลทที่	ค่าที่อ่านได้	ค่าที่ปรับแล้ว	เพลทที่	ค่าที่อ่านได้	ค่าที่ปรับแล้ว
1	0.546		2	0.532	0.532	3	0.637	
1	0.458	0.458	2	0.636		3	0.531	0.57
1	0.501	0.501	2	0.578		3	0.434	0.434
1	0.466	0.466	2	0.654		3	0.526	0.526
1	0.477	0.477	2	0.614		3	0.452	0.452
1	0.438		2	0.472	0.472	3	0.472	0.472
1	0.587		2	0.454		3	0.435	0.435
1	0.546	0.546	2	0.537	0.537	3	0.548	
1	0.514	0.514	2	0.531	0.531	3	0.614	
1	0.464	0.464	2	0.541	0.541	3	0.697	
1	0.439		2	0.524	0.524	3	0.477	0.477
1	0.51	0.51	2	0.499	0.499	3	0.424	
1	0.501	0.501	2	0.547	0.547	3	0.526	0.526
1	0.512	0.512	2	0.532	0.532	3	0.511	0.511
1	0.524	0.524	2	0.5	0.5	3	0.524	0.524

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวปิยมาศ คณิตจักริณรัตน์  
วัน เดือน ปีเกิด 25 กุมภาพันธ์ 2519

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนครสวรรค์  
จังหวัดนครสวรรค์ ปีการศึกษา 2536  
สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)  
สาขาวิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2540