ภาคผนวก

อตฺตานํ ทมยนฺติ ปณฺฑิตา
CHIANG MAI UNIVERSITY 1964
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 กายวิภาคศาสตร์

สารเคมีและวิธีการเตรียมตัวอย่างชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวร

1. น้ำยาสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) คือ น้ำยา FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

ethyl alcohol 95%	50	มิลลิลิตร
formalin	10	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35	มิลลิลิตร

2. น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ซึ่งมีส่วนผสมของ ethyl alcohol 95%, absolute alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่นในอัตราส่วนต่างกัน ตั้งแต่ระดับ 50% ของน้ำยาไปจนถึง 100% ของน้ำยา ตามตารางภาคผนวกที่ 1

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์

สารเคมี (มิลลิลิตร)	อัตราส่วน				
	50%	70%	85%	95%	100%
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-
ethyl alcohol 95%	40	50	50	45	-
TBA	10	20	35	55	75*
absolute ethyl alcohol	-	-	-	-	25

* ผสมสี erythrosin

3. สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการผ่าตัด (embedding method)ได้แก่ paraplast

4. น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

ไข่ขาว	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	49	มิลลิลิตร

เมื่อจะนำไปใช้ให้ผสมน้ำยา 1 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. xylene

6. สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ คือ Dalafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

ammonium aluminium sulfate	400	มิลลิลิตร
glycerol	100	มิลลิลิตร
methyl alcohol	100	มิลลิลิตร
ethyl alcohol 95%	25	มิลลิลิตร
hematoxylin	4	มิลลิลิตร

7. สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ ได้แก่ Canada balsam (Merck)

การทดลองที่ 4 แบบแผน allozyme

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer คือ Tris – HCl 0.05 M pH 8.4
   1.1 ascorbic acid
   1.2 cysteine
   1.3 $CaCl_2$
   1.4 NaCl
   1.5 Na_2-EDTA
   1.6 nicotine

2. สารเคมีที่ใช้เป็น electrode buffer
   2.1 NaOH
   2.2 Glycine
   2.3 Tris
   2.4 น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ marker dye solution
    3.1 Bromophenol blue
    3.2 Glycerol
    3.3 Tris – chloride buffer pH 6.7

4. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของเจล มีดังนี้
    4.1 Acrylamide stock solution (acrylamide 28 กรัม และ bis – acrylamide 0.74 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)
    4.2 Ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้
    4.3 Tris – chloride buffer pH 6.7
    4.4 Tris – chloride buffer pH 8.9

5. สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์
    5.1 Acetone
    5.2 Absolute alcohol
    5.3 Acetic acid
    5.4 β- naphthol
    5.5 Fast blue B salt
    5.6 3 – amino – 9 – ethyl carbazole
    5.7 α- naphthyl acetate
    5.8 Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0
    5.9 Tris buffer 0.1 M pH 4.0
    5.10 Tris – (hydroxymethyl) aminomethane
    5.11 Hydrogen peroxide 3 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการเตรียมสารทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม extraction buffer

Tris-HCl	0.05 M pH 8.4	100.00	มิลลิลิตร
NaCl	150 mM	1.7532	กรัม
cysteine	10 mM	0.1212	กรัม
ascorbic acid	1 mM	0.0352	กรัม
$CaCl_2$	1 mM	0.0294	กรัม
Na_2-EDTA	1 mM	0.7444	กรัม
nicotine	2 %	2.00	มิลลิลิตร

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Tris-HCl buffer 0.05 M pH 8.4

Tris	1.1057	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.4 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม electrode buffer

Tris	6.0	กรัม
glycine	28.8	กรัม

เตรียมสารละลายโดยการละลาย Tris 6.0 กรัม และ glycine 28.8 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.3 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้จึงเติมน้ำกลั่นไปอีก 10 เท่า เพื่อทำให้มีค่า pH ประมาณ 8.3 โดยไม่จำเป็นต้องปรับค่า pH

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม marker dye solution

bromophenol blue	0.05	กรัม
glycerol	1.00	มิลลิลิตร

อัตราส่วน marker dye solution ต่อตัวอย่างเอนไซม์ เท่ากับ 1 : 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การเตรียมเจล

Stock A : polyacrylamide gel 30 เปอร์เซ็นต์

acrylamide	28.00	กรัม
N,N-methylene bisacrylamide gel	0.74	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

Stock B : Tris-HCl buffer pH 8.9 ประกอบด้วย

HCl 1 N	48.00	มิลลิลิตร
Tris	36.60	กรัม
TEMED	0.23	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

Stock C : Tris-HCl buffer pH 6.7 ประกอบด้วย

HCl 1 N	48.00	มิลลิลิตร
Tris	5.98	กรัม
TEMED	0.46	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

Stock D : 0.1 % ammonium persulfate

ammonium persulfate	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

นำ stock A B C และ D มาผสมในอัตราส่วนดังตารางภาคผนวกที่ 2

ตารางภาคผนวกที่ 2 อัตราส่วนในการเตรียมเจล

Stock Solution	Separating gel 8.5 %	
A	12.14	มิลลิลิตร
B	5.00	มิลลิลิตร
C	-	มิลลิลิตร
D	300.00	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	22.86	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การเตรียม phosphate buffer 0.1 M pH 6.0

การเตรียม stock solution

A : 0.1 M solution of monobasic sodium phosphate (13.9 กรัมใน 1,000 มิลลิลิตร)

B : 0.1 M solution of dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัมหรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัมใน 1,000 มิลลิลิตร)

ใช้สารละลาย A 87.7 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 12.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นพร้อมกับปรับ pH ให้ได้ 6.0 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

7. การเตรียม acetate buffer 0.5 M pH 4.8

การเตรียม stock solution

A : 0.5 M solution of acetic acid (28.875 กรัมใน 1,000 มิลลิลิตร)

B : 0.5 M solution of sodium acetate (C_2H_2ONa 41.0 กรัม หรือ $C_2H_2O_2Na.3H_2O$ ใน 1,000 มิลลิลิตร)

ใช้สารละลาย A 20.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 30.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นพร้อมกับปรับ pH ให้ได้ 4.8 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

8.1 Acid phosphatase

(1) acetate buffer 0.5 M pH 4.8	100.0	มิลลิลิตร
(2) fast blue-B salt	100.0	มิลลิกรัม
(3) 1%-napthyl acid phosphate (monosodium salt)	100.0	มิลลิกรัม
(4) $MgCl_2$ 10 เปอร์เซ็นต์	10	หยด

วิธีการเตรียม นำสารในข้อ 1, 2 และ 3 ละลายให้เข้ากันดี แล้วกรองในที่มืด ก่อนย้อมสีเติมสารในข้อ 4 ลงไป แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 30 – 60 นาที จากนั้นล้างเจลให้สะอาด และเก็บเจลในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินและตรึงสีย้อม

8.2 Esterase

(1) phosphate buffer 0.1 M pH 6.0	100.0	มิลลิลิตร
(2) fast blue-B salt	100.0	มิลลิกรัม
(3) 1 % napthyl acetate in absolute alcohol	3.0	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการเตรียม นำสารในข้อ 1 และ 2 ละลายให้เข้ากันดี แล้วกรองในที่มืด ก่อนย้อมสีเติมสารในข้อ 3 ลงไป แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 30 – 60 นาที จากนั้นล้างเจลให้สะอาด และเก็บเจลในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินและตรึงสีย้อม

8.3 Malate dehydrogenase

(1) Tris-HCl 0.1 M pH 7.5	100.0	มิลลิลิตร
(2) L-malic acid	200.0	มิลลิกรัม
(3) NAD	40.0	มิลลิกรัม
(4) NBT	20.0	มิลลิกรัม
(5) PMS	4.0	มิลลิกรัม

วิธีการเตรียม นำสารในข้อ 1 ถึง ข้อ 5 ละลายให้เข้ากันดี แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 30 – 60 นาที จากนั้นล้างเจลให้สะอาด และเก็บเจลในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินและตรึงสีย้อม

8.4 Peroxidase

(1) Stock A :	3 amino-9 ethylcarbazole	420	มิลลิกรัม
	β-napthol	290	มิลลิกรัม
	acetone	200	มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

(2) Stock B :	Tris buffer 0.1 M pH 4.0		
	Tris-hydroxymethyl aminomethane	3.78	กรัม
	acetic acid	4.05	มิลลิลิตร

ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ให้ได้ 4.0 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ปริมาตร 2.5 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

(3) Stock C : H_2O_2 3 เปอร์เซ็นต์

เตรียมจาก H_2O_2 30 เปอร์เซ็นต์ 10.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการเตรียม ใช้อัตราส่วน Stock A : B : C = 20 : 80 : 1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 30 – 60 นาที จากนั้นล้างเจลให้สะอาด และเก็บเจลในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินและตรึงสีย้อม

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นายพิชัย ใจกล้า
ที่อยู่ที่ติดต่อได้	เลขที่ 1 หมู่ 2 ตำบลเชียงบาน อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา 56110 โทรศัพท์ 0-5441-6689, 01-2809398 E-mail address : pchaikla@yahoo.com
วัน เดือน ปีเกิด	11 พฤษภาคม 2521

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	สถานศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
มัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนเชียงคำวิทยาคม จังหวัดพะเยา	พ.ศ. 2537
มัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนเชียงคำวิทยาคม จังหวัดพะเยา	พ.ศ. 2540
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่	พ.ศ. 2544

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved