

## ภาคผนวก

### สารเคมีและการเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์

#### 1. น้ำยาสกัดเอนไซม์ (extraction buffer)

ตารางภาคผนวกที่ 1 สารที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาสกัด (extraction buffer)

| Stock Solution                  | ปริมาตรที่ใช้ |
|---------------------------------|---------------|
| 0.2 M Tris-buffer pH 8.4        | 5 มล          |
| 0.5 M EDTA                      | 0.06 มล       |
| PVPP-10                         | 0.5 กรัม      |
| 0.5 M DTT                       | 0.12 มล       |
| 14.3 M $\beta$ -Mercaptoethanol | 21 ไมโครลิตร  |

วิธีการเตรียมทำโดยการผสมสารตามตารางภาคผนวกที่ 1 เข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำกลั่น  
ปรับปริมาตรให้ได้ 30 มล ใส่ลงในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

#### 2. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ separating gel 7.5%

สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบแสดงไว้ในตารางภาคผนวก 1

เตรียมโดยผสมน้ำกลั่นกับ 1.5 M tris pH 8.8 และ acrylamide 30% เข้าด้วยกัน แล้ว  
ค่อย ๆ เติม 10% APS และ TEMED คนให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้

#### 3. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ loading dye คือ 10% glycerol และ 0.5% bromophenol blue

#### 4. สารเคมีที่ใช้เป็น running buffer คือ tris 3 กรัม และ glycine 14.4 กรัม

เตรียมสารละลายโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้  
ได้ 500 มล เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

## 5. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีเอนไซม์

## 5.1 Acid phosphatase (ACP)

|  |     |    |
|--|-----|----|
| acetate buffer pH 6.0                  | 100 | มล |
| fast garnet GBC diasodium salt         | 50  | มล |
| disodium $\alpha$ - naphthyl phosphate | 25  | มล |

## 5.2 Diaphorase (DIA)

|                       |    |                |
|-----------------------|----|----------------|
| Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 | 25 | มล             |
| NADH                  | 10 | มิลลิกรัม (มก) |
| DCIP 1 % in water     | 1  | ไมโครลิตร      |
| MTT 10 % in water     | 10 | ไมโครลิตร      |

## 5.3 Esterase (EST)

|                            |       |      |
|----------------------------|-------|------|
| phosphate buffer pH 6.0    | 100   | มล   |
| fast blue B-salt           | 0.15  | กรัม |
| $\alpha$ -naphthyl acetate | 0.003 | กรัม |

## 5.4 Glucose dehydrogenase (GDH)

|   |     |           |
|---|-----|-----------|
| Tris-HCl 0.1 M pH 7.5                   | 25  | มล        |
| $\alpha$ -D glucose                     | 4   | กรัม      |
| NAD <sup>+</sup> 10 % in water/methanol | 100 | ไมโครลิตร |
| NBT 10 % in water                       | 50  | ไมโครลิตร |
| PMS                                     | 10  | ไมโครลิตร |

## 5.5 Aspartate amino transferase (GOT)

|                                     |    |           |
|-------------------------------------|----|-----------|
| Tris-HCl 0.1 M pH 8.0               | 25 | มล        |
| $\alpha$ -ketoglutaric acid         | 25 | มก        |
| Aspartic acid                       | 50 | มก        |
| Piridoxal 5-phosphate 10 % in water | 10 | ไมโครลิตร |
| Fast Blue BB                        | 50 | มก        |

## 5.6 Lucine aminopeptidase (LAP)

|                                |     |    |
|--------------------------------|-----|----|
| Na phosphate 1 M pH 6          | 25  | มล |
| Mgcl <sub>2</sub> 1 M          | 0.5 | มล |
| L-leucine $\beta$ -naphyl acid | 100 | มก |

|               |    |    |
|---------------|----|----|
| O-Dianisidine | 20 | มก |
|---------------|----|----|

## 5.7 Malate dehydrogenase (MDH)

|                       |     |           |
|-----------------------|-----|-----------|
| tris-HCl 0.1 M pH 7.5 | 25  | มล        |
| L-malic acid          | 50  | มก        |
| NAD 10 % in water     | 100 | ไมโครลิตร |
| NBT 10 % in methanol  | 50  | ไมโครลิตร |
| PMS 10 %              | 10  | ไมโครลิตร |

แช่ในที่มืด ที่มีอุณหภูมิ 37 °ซ

## 5.8 Peroxidase (POX)

|                                   |       |           |
|-----------------------------------|-------|-----------|
| tris-HCl 0.1 M pH 4.0             | 80    | มล        |
| 3-amino-9-ethylcarbazole          | 0.042 | กรัม      |
| $\beta$ -naphthol                 | 0.029 | กรัม      |
| 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 100   | ไมโครลิตร |

## 5.9 Shikimate dehydrogenase (SKD)

|                                 |     |           |
|---------------------------------|-----|-----------|
| tris-HCl 0.1 M pH 8.0           | 25  | มล        |
| Shikimic acid                   | 15  | มก        |
| NADP <sup>+</sup> 10 % in water | 100 | ไมโครลิตร |
| NBT 10 % in water/methanol      | 50  | ไมโครลิตร |
| PMS 10 % in water               | 10  | ไมโครลิตร |

## 5.10 Superoxide dismutase (SOD)

|                                   |    |    |
|-----------------------------------|----|----|
| Na phosphate buffer 0.05 M pH 7.5 | 25 | มล |
|-----------------------------------|----|----|

|     |   |    |
|-----|---|----|
| MTT | 5 | มก |
|-----|---|----|

(เก็บในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 37 °ซ ประมาณ 20 นาที)

|                                   |    |    |
|-----------------------------------|----|----|
| Na phosphate buffer 0.05 M pH 7.5 | 25 | มล |
|-----------------------------------|----|----|

|       |     |    |
|-------|-----|----|
| TEMED | 0.1 | มล |
|-------|-----|----|

|            |      |    |
|------------|------|----|
| Riboflavin | 0.25 | มก |
|------------|------|----|

(เก็บไว้ในที่มืด)

## ประวัติผู้เขียน

|                           |   |
|---------------------------|---|
| ชื่อ-สกุล                 | นางสาวหทัยรัตน์ ไทอนุรักษ์  |
| วัน เดือน ปี เกิด         | 2 มกราคม 2524   |
| ประวัติการศึกษา           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ปีการศึกษา 2535 สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาโรงเรียนไชยโรจน์ วิทยา เชียงใหม่</li> <li>- ปีการศึกษา 2541 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาโรงเรียนวัดโนนทัยพายัพ เชียงใหม่</li> <li>- ปีการศึกษา 2545 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต พืชศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตลำปาง</li> </ul> |
| ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ | 8/6 ซอยอินทนิล ถนนมหาริดล ตำบลสุเทพ อำเภอเมืองเชียงใหม่<br>จังหวัดเชียงใหม่ 50200<br>โทรศัพท์ 0-5380-8466   |