ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก

การเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลายเข้มข้น

1. 50X Tris acetate buffer (50X TAE buffer)

1.1 Tris – base 242.0 กรัม

1.2 glacial acetic acid 57.1 กรัม

1.3 0.5 M EDTA pH 8.0 100.0 กรัม

ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Tris ethylenediaminetetra acetic acid buffer (TE buffer pH 8.0)

2.1 10mM Tris – HCI

2.2 1mM EDTA

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. 1M Tris – HCI pH 8.0

ชั่งสาร Tris base 121.1 กรัมละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 โดยใช้กรด HCI เข้มข้นแล้วปรับปริมาตรด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. 0.5 M EDTA

ชั่งสาร disodium ethylenediamine tetraacetate – $2H_2O$ 136.1 กรัม ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยการใช้ magnetic stirrer จากนั้นเติม NaOH เพื่อปรับให้ได้ pH 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA จะละลายได้หมดพอดี ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. 5 M NaCI

ชั่งสาร NaCI 29.2 กรัม ละลายน้ำโดยปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไป นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. 40% Acrylamide Solution

6.1 Acrylamide 38 กรัม

6.2 Bis – Acrylamide 2 กรัม

ละลาย Acrylamid และ Bis – Acrylamide ในน้ำกลั่นปริมาตร 50–80 มิลลิลิตรก่อนอาจใช้ความร้อนช่วยในการละลาย แต่ระวังอย่าให้สารละลายร้อนเกินไป และควรใช้ magnetic stirrer (อย่าให้เกิดฟองอากาศ) เมื่อสารละลายหมดจึงค่อยเติมน้ำปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. Polyacrylamide Gel

Polyacrylamide Gel ที่ใช้ คือ 4% ใช้สารละลายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อแผ่น ประกอบด้วย

7.1 40% Acrylamide	0.5 มิลลิลิตร
7.2 10X TAE buffer	0.5 มิลลิลิตร
7.3 10% Ammonium persulfate	7.5 ไมโครลิตร
7.4 Temed	3.5 ไมโครลิตร
7.5 น้ำกลั่น	4.0 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน (ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ) ยกเว้น Temed ให้ใส่เป็นลำดับสุดท้ายก่อนที่จะใส่สารละลายทั้งหมดลงในกระจกที่เตรียมสำหรับใส่เจล เมื่อใส่สารละลายทั้งหมดในกระจกแล้วจึงควรใส่ comb ทันทีอย่างระมัดระวัง ขบวนการ polymerization จะสมบูรณ์ใช้เวลา 15-20 นาที จึงสามารถนำเจลมาใช้ได้ทันที ภายหลังการทำ electrophoresis จะนำเจลไปย้อมด้วย Ethedium bromide ประมาณ 1 นาทีก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Gel dryer, GD 2000

8. 10% Ammonium persulfate

ชั่งสาร Ammonium persulfate 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

9. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งสารละลายหมด ซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการเตรียมสารนี้จะต้องระมัดระวังมาก โดยการใส่ถุงมือและอย่าหายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagent

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้อบอุณหภูมิสูง (Hot air oven)
2. หม้อนึ่งความดัน(Autoclave)
3. เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter) รุ่น CG 842 ยี่ห้อ Schott-Gerate
4. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)
5. Gel documentation (ยี่ห้อ syngene, รุ่น Gene genius)
6. เครื่องทำความเย็น ได้แก่ ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส และตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส)
7. Adjustable automatic pipettes
8. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ 0.2 มิลลิลิตร
9. Pipette tip
10. Thermal cycler : GeneAmp PCR system (MJ Research model PTC 100)
11. อุปกรณ์อิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ชนิดแนวนอนของบริษัท Amersham pharmacia biotech รุ่น Classic™ CSSU1214
12. Vortex mixer รุ่น VX100 ยี่ห้อ Labnet
13. บิกเกอร์
14. ตู้ดูดไอพิษ
15. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
16. เตาไมโครเวฟ
17. Micro-centrifuge รุ่น GMC-260 ยี่ห้อ Daihan Lab Tech
18. เครื่องชั่งแบบละเอียด
19. Magnetic stirrer รุ่น HS115 ยี่ห้อ HL Instrument

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

20. Shaking incubator รุ่น DK-SI001a ยี่ห้อ Daili
21. NanoDrop 1000 UV-Vis spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000 ยี่ห้อThermo Fisher Scientific
22. Gel dryer, รุ่น GD 2000 ยี่ห้อ Amersham Biosciences

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายณัฐพร จันทะ
วัน เดือน ปี เกิด	1 พฤษภาคม 2526
ประวัติการศึกษา	-สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสามัคคีวิทยาคม จังหวัดเชียงราย ปีการศึกษา 2545 -สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา อารักขาพืช (กีฏวิทยา) คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปีการศึกษา 2549
ทุนการศึกษา	
ปีการศึกษา 2551	ได้รับทุนการศึกษา และวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในระดับปริญญาโท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved