

ภาคผนวก

ผนวก ก

เครื่องมือ สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

1. เครื่องมือ

- 1.1 ชุดอุปกรณ์ Polyacrylamide gel electrophoresis unit (Atto รุ่น AE-6530 mPAGE)
- 1.2 คอลัมน์แยกโมเลกุลแบบเจลฟิльтраชัน Superdex™GL 200, Gel filtration column (Amersham)
- 1.3 Akta Explorer (Amersham)
- 1.4 Akta Primer (Amersham)
- 1.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง, UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu)
- 1.6 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า, DC Power supply (Hoefer รุ่น PS 500XT)
- 1.7 เครื่องวิเคราะห์เจล, UV transilluminator BioDoc-It System (UVP)
- 1.8 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ, Incubator (BINDER)
- 1.9 เครื่องปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูง, Sonicator (Vibracell)
- 1.10 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมความเย็น, Refrigerated centrifuge (Jouan)
- 1.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก, Microcentrifuge (Heraeus รุ่น Biofuge pico)
- 1.12 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง, pH-meter (Beckman)
- 1.13 เครื่องแยกเก็บสารอัตโนมัติ, Fraction collector (Akta)
- 1.14 เครื่อง Fast flow protein liquid chromatography, FPLC (Amersham)
- 1.15 เครื่อง Spectrofluorometer Jasco FP-6500 (Jasco)
- 1.16 ปิเปตต์อัตโนมัติ, Autopipette (Eppendroff)
- 1.17 เครื่องชั่งวิเคราะห์, Analytical balance (Sartorius รุ่น BL 150)
- 1.18 เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก, Magnetic stirrer (Innova)
- 1.19 เครื่องผสมสาร, Vortex mixer (Fisher scientific)
- 1.20 หม้อนึ่งความดันฆ่าเชื้อจุลินทรีย์, Autoclave (TOMY รุ่น HA240M)
- 1.21 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ, Water bath (Grant)

- 1.22 ตู้ปลอดเชื้อ, Advance biosafety cabinet (Nuaire class II)
- 1.23 เครื่องเขย่าขนาดเล็ก, Shaker (Labnet รุ่น ORBIT LS)
- 1.24 อ่างน้ำป้อนคลื่นเสียงความถี่สูง, Sonicator bath (Bandelin รุ่น sonorex super RK 225H)
- 1.25 Extruder Lipofast™ (Avestin)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีทั่วไป

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade, AG หรือ analytical reagent, AR) หรือเทียบเท่า แบ่งเป็นประเภทต่างๆได้ดังนี้

- 2.1.1 Absolute Ethanol, C_2H_5OH (Merk)
- 2.1.2 40% Acrylamide (Bio-Rad)
- 2.1.3 Agarose (Seakem)
- 2.1.4 95% Alcohol
- 2.1.5 Ampicillin (Sigma)
- 2.1.6 Ammonium persulfate, $(NH_4)_2S_2O_8$ (Promega)
- 2.1.7 Glacial Acetic acid, CH_3COOH (Merk)
- 2.1.8 Bovine serum albumin, BSA (Innova)
- 2.1.9 Bromophenol blue (Sigma)
- 2.1.10 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)
- 2.1.11 1,4-Dithiothreitol, DTT (Merk)
- 2.1.12 Deoxyribonucleotide triphosphated, dNTPs (Fermentas)
- 2.1.13 Glycerol (Sigma)
- 2.1.14 Glycine, NH_2CH_2COOH (Merk)
- 2.1.15 Hydrochloric acid, HCl
- 2.1.16 Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, IPTG (Promega)
- 2.1.17 6x loading dye (Fermentas)

- 2.1.18 Methanol, CH_3OH (CARLO ERBA)
- 2.1.19 *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (Invitrogen)
- 2.1.20 Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4
- 2.1.21 Potassium chloride, KCl (Sigma)
- 2.1.22 Sodium dodecyl sulfate, SDS (CARLO ERBA)
- 2.1.23 Sodium Chloride, NaCl (CARLO ERBA)
- 2.1.24 Sodium hydroxide, NaOH (CARLO ERBA)
- 2.1.25 Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4 (USB)
- 2.1.26 *N,N,N',N'*-tertramethylethylene diamine, TEMED (Fluka)
- 2.1.27 Tris(hydroxymethyl)amionomethane, (Merck)
- 2.1.28 Triton-X-100 (Research Organics)
- 2.1.29 Egg-yolk phosphatidylethanolamine (Sigma)
- 2.1.30 Chloesterol (Sigma)
- 2.1.31 Stearylamine (Sigma)
- 2.1.32 Perflorodecanethiol (Sigma)

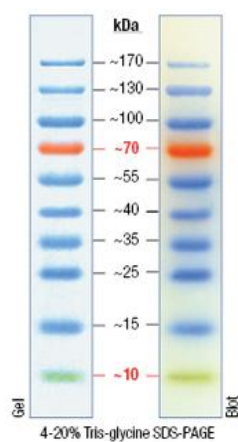
2.2 เอนไซม์และบัฟเฟอร์

- 2.2.1 เอนไซม์ Trypsin (Calbiochem)
- 2.2.2 เอนไซม์ Chymotrypsin (Calbiochem)

2.3 โปรตีนมาตรฐานสำหรับพอลิอะครีลาไมด์อิเล็กโตรโฟรีซิส

ภาพผนวกที่ 1

PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder



ที่มา: Fermentas

3. การเตรียมสารเคมี

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.1.1 อาหารเหลว Luria-Bertani (LB)

Bacto-yeast extract	5.0	กรัม
Bacto-tryptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2 ภู่น Luria-Bertani (LB)

Bacto-yeast extract	2.0	กรัม
Bacto-tryptone	4.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Agar	6.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 400 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาเทลงจานเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.1.3 ภู่น Luria-Bertani (LB) ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Bacto-tryptone	2.0	กรัม
Bacto-yeast extract	4.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Agar	6.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 400 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมแอมพิซิลินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเทลงจานเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.1.4 Luria-Bertani (LB) agar ที่มีคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 34

ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร

Bacto-tryptone	2.0	กรัม
Bacto-yeast extract	4.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Agar	6.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 400 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้นให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 34 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเทลงจานเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

3.2.1 การเตรียมสารละลาย 10X Phosphate buffer saline (PBS)

ปริมาตร 1 ลิตร

(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4)

NaCl	80	กรัม
KCl	20	กรัม
Na_2HPO_4	14.4	กรัม
KH_2PO_4	2.4	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับพีเอชด้วย 1 M HCl ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือกรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 การเตรียมสารละลาย 1M Tris HCl

ละลายผง Tris base 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย concentrated HCl ที่ปริมาตรต่างให้ได้พีเอชตามต้องการ (ตารางผนวกที่ 1) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ตารางผนวกที่ 1

ปริมาณสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่ใช้เตรียม 1M Tris HCl ที่พีเอชต่างๆ

pH	HCl (ml)
pH 7.0	70
pH 7.5	60
pH 8.0	40

3.3 การเตรียมสารสำหรับการทำ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

3.3.1 สารละลาย 40% Acrylamide mix (29:1) ปริมาตร 1 ลิตร

Acrylamide 386.8 กรัม

Bis-acrylamide 13.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองและเก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 สารละลาย 1.5 M Tris-HCl/0.4% SDS, พีเอช 8.8 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

Tris base 45.41 กรัม

SDS 1.00 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชด้วย 1 M HCl ให้เป็น 8.8 ก่อน จึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มิลลิลิตร

3.3.3 สารละลาย 0.5 M Tris-HCl/0.4% SDS, พีเอช 6.8 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

Tris base 15.14 กรัม

SDS 1.00 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชด้วย 1 M HCl ให้เป็น 6.8 ก่อน จึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มิลลิลิตร

3.3.4 12% Separating gel สำหรับเจล 1 แผ่น

น้ำกลั่น	3.30	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl/0.4% SDS (pH 8.8)	1.90	มิลลิลิตร
40% Acrylamide mix	2.25	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulphate	50	ไมโครลิตร
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	5	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันตามลำดับ แล้วเทลงในแผ่นกระจกทันที
ให้มีปริมาตรเป็น 3 ใน 4 ส่วนของแผ่นกระจก เทตามด้วย 70% ethanol ปิดทับด้านบนเพื่อให้ผิว
เจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที จึงเท ethanol ด้านบนออก

3.3.5 4% Stacking gel สำหรับเจล 1 แผ่น

น้ำกลั่น	1.65	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl /0.4% SDS (pH 6.8)	625	ไมโครลิตร
40% Acrylamide mix	200	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulphate	30	ไมโครลิตร
TEMED	3	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน เทลงในแผ่นกระจกเหนือ separating
gel ที่แข็งตัวแล้วพร้อมเสียบแผงหัวทันที ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที

3.3.6 สารละลาย 5X Sample buffer 100 มิลลิลิตร

(250 mM Tris HCl pH6.8, 10% SDS, 50% Glycerol, 0.02%
bromophenol blue, 0.5M DTT)

2M Tris-HCl (pH 6.8)	12.5	มิลลิลิตร
SDS	10.0	กรัม
50% Glycerol	5.0	มิลลิลิตร
0.04% bromophenol blue	52	มิลลิลิตร
1M DTT*	0.5	มิลลิลิตร

* เดิมก่อนใช้

เวลาใช้ให้ผสม 5X sample buffer กับโปรตีนในอัตราส่วน 1:4

3.3.7 สารละลาย 10X Running buffer 1 ลิตร

(1x: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, พีเอช 8.3)

Tris base	30.3	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร โดยไม่ต้องปรับ pH

3.3.8 สารละลาย Staining solution 1 ลิตร

Coomassie brilliant blue

R-250	1	กรัม
Methanol	450	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

3.3.9 สารละลาย Destaining solution 500 มิลลิลิตร

Methanol	100	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

3.4 การเตรียมไลโปโซมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Egg-yolk phosphatidylethanolamine

(EYPE) 100 mg/ml	139.9	ไมโครลิตร
Cholesterol 50 mg/ml	96	ไมโครลิตร
Stearylamine 100 mg/ml	120.9	ไมโครลิตร

สารละลายทั้งหมดละลายอยู่ใน Chloroform/Methanol 2:1

ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกันและระเหย Chloroform/Methanol

ออกโดยผ่านก๊าซไนโตรเจนแห้ง โดยทำบนเครื่องเขย่าหลอดทดลอง ภายในตู้ดูดควัน จากนั้นเติม บัฟเฟอร์พีเอชหรือคาร์บอนेट 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ไลโปโซมที่มีอัตราส่วน EYPE: cholesterol: stearylamine 4:3:1 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการเตรียมไลโปโซม

สำหรับใช้กับเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน จะเติม perfluorodecanethiol 0.02 ไมโครลิตร ในขั้นตอนนี้ จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

การใช้ไลโปโซมแต่ละครั้งจะเติมบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการเตรียม 900 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำปละลายคลื่นเสียงความถี่สูงที่ใส่น้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปผ่าน extruder ที่ใช้แผ่นกรอง (membrane) ขนาด 0.1 ไมโครเมตร 19 ครั้ง เพื่อให้ได้ไลโปโซมที่มีขนาดเท่ากัน