ภาคผนวก

1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

Bradford dye solution

Coomassie brillian blue G-250	10	mg
95%Ethanol	5	ml
85%Phosphoric acid	10	ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ใส่ขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid reagent

Solution A : ละลาย3,5-Dinitrosalicylic acid 10 g ใน 2N NaOH 200 ml และต้มให้เดือดเพื่อให้ละลายได้สมบูรณ์

Solution B : ละลายโซเดียมโพแตสเซียมตาร์เตรต ($NaKC_4H4O6.{}_4H2O$) ในน้ำกลั่น 500 ml

ผสม Solution A และ Solution B และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโนในน้ำหมักผักผลไม้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ

สารละลาย Mobile phase :

Iso-propanol	15	ml
30%Ammonium hydroxide	3	ml
Water	2	ml

เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 ml ปิดปากบีกเกอร์ด้วย Aluminium foil เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้ภายในบีกเกอร์อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

สารละลายNinhydrin

Ninhydrin	0.4	g
n-Butanol	100	ml

4. การเตรียมสารละลายสำหรับทำความสะอาดตัวอย่างด้วย 2D-clean up kit

สารละลาย Rehydration buffer :

Urea	10.51	g
Thiourea	3.81	g
CHAPS	0.2	g
1% Bromophenol blue	50	µl

5. การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

5.1) Solution A (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8) ประกอบด้วย :

Tris	9.1	g
1 M HCl	12.0	ml
SDS	0.2	g

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่น DDW แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

5.2) Solution B (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) ประกอบด้วย :

Tris	3.0	g
1 M HCl	24.0	ml
SDS	0.2	g

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่น DDW แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

5.3) Solution C (30% acrylamide solution) ประกอบด้วย :

Acrylamide	30.0	g
N,N-methylene bis acrylamide	0.8	g

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น DDW แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

5.4) Solution E (Running buffer 2x,) ประกอบด้วย :

Glycine	28.8	g
Tris	6.0	g
SDS	1.0	g

ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น DDW แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น ก่อนใช้ต้องเจือจางให้เป็น 1x

5.5) Solution D (10% APS) ประกอบด้วย :

Ammonium peroxodisulfate	0.05	g

ละลายในน้ำกลั่น DDW 0.5 ml แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

5.6) Solubilizing solution (2x) : with β-mercaptoethanol in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.025% BPB (Bromophenol blue) ประกอบด้วย :

Solution B	1.0	ml
SDS	0.2	g
Glycerol	1.0	ml
1% BPB-methanol solution	0.25	ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 10 ml ด้วยน้ำกลั่น DDW เป็น stock เก็บไว้ในตู้เย็น

5.7) Solubilizing solution (2x) : without β-mercaptoethanol in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.025% BPB (Bromophenol blue) ประกอบด้วย :

Solution B	1	ml
SDS	0.2	g
Glycerol	1	ml
1%BPB methanol solution	0.25	ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น DDW เป็น stock เก็บไว้ในตู้เย็น

5.8) Staining solution : 0.1% CBB in 50% methanol, 10% acetic acid ประกอบด้วย :

CBB	0.5	g
Methanol	250.0	ml

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 ml ด้วยน้ำกลั่น DDW

5.9) Destaining solution :

Acetic acid	100	ml
Methanol	400	ml
Water	500	ml

5.10) Marker (low molecular weight marker, BioRad) ประกอบด้วย :

Phosphorylase; 97 kDa, Albumin; 66 kDa, Ovalbumin; 45 kDa, Carbonic anhydrase; 30 kDa, Trypsin inhibitor; 20.1 kDa, α-lactalbumin; 14.4 kDa การเตรียม : นำ commercial LMW 1 vial เติมด้วย loading buffer (2x) ปริมาตร 200 µl นำไปต้มในน้ำเดือด 2 นาที และใช้ load 3 µl/well

6. การเตรียมสารละลายสำหรับ Protease activity gel staining

6.1) Gelatin (1mg/ml)

ชั่ง Gelatin มา 0.005 g ละลายในน้ำกลั่น 5 ml นำไปต้มในน้ำเดือดเพื่อละลาย gelatin ให้หมด

6.2) 25% iso-propanol

ตวง Iso-propanol มา 125 ml ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

6.3) 0.3 M Tris-HCl. pH 7.0 (Stock solution)

ชั่ง Tris 36.34 g ละลายในน้ำกลั่น DDW เป็น Stock เก็บไว้ในตู้เย็น

6.4) 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0

เจือจาง 300 ml ของ 0.3 M Tris-HCl, pH 7.0 ด้วยน้ำกลั่น DDW จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 900 ml

6.5) 0.01 M Tris-HCl, pH 7.0

เจือจาง 100 ml ของ 0.1 M HCl, pH 7.0 ด้วยน้ำกลั่น DDW จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml

6.6) 0.2% Coomassie brillian blue R250

Coomassie Brillian Blue R-250	0.2	g
Methanol	40	ml
Glacial acetic acid	10	ml
Double distrilled water	50	ml

6.7) Destaining solution

Glacial acetic acid	100	ml
Methanol	400	ml
Water	500	ml

6.8) 1%BPB-methanol solution

Bromophenol blue	100	mg
Tris-base	60	mg

ละลายในน้ำกลั่น 2 ครั้ง และปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml

6.9) Solubilizing solution (2x) : without β-mercaptoethanol (50 mM Tris-HCl, pH6.8, 2%SDS, 10%glycerol, 0.025%BPB)

Solution B	1	ml
SDS	0.2	g
Glycerol	1	ml
1%BPB methanol solution	0.25	ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น

7. การเตรียมสารละลายสำหรับ RNase activity gel staining

7.1) 25-30 mg/ml RNA solution (RNase free)

ชั่ง Ribonucleic acid 0.025-0.030g ละลายใน Solution A 1 ml

7.2) 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0

เจือจาง 300 ml ของ 0.3 M Tris-HCl, pH 7.0 ด้วยน้ำกลั่น DDW จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 900 ml

7.3) 0.01 M Tris-HCl, pH 7.0

เจือจาง 100 ml ของ 0.1 M HCl, pH 7.0 ด้วยน้ำกลั่น DDW จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml

7.4) 25% iso-propanol/0.1M Tris-HCl , pH7.0

Iso-propanol	50	ml
0.1 M Tris-HCl, pH7.0	20	ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 200 ml ด้วยน้ำกลั่น

7.5) 0.01 M $ZnCl_2$ (Stock solution)

ชั่ง $ZnCl_2$ 0.68 g ละลายในน้ำกลั่น 2 ครั้ง ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ml

7.6) 2μM $ZnCl_2$/0.01 M Tris-HCl, pH7.0

0.01 M $ZnCl_2$	43.6	μl
0.1 M Tris-HCl, pH7.0	20	ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

7.7) 0.2%Toluidine blue O/0.01 M Tris-HCl, pH7.0

Toluidine blue O	0.2	g
0.1 M Tris-HCl, pH7.0	10	ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

7.8) 10%Glycerol/0.01 M Tris-HCl, pH7.0

เจือจาง Glycerol 20 ml ใน 0.1 M Tris-HCl, pH7.0 20 ml แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 200 ml ด้วยน้ำ

7.9) RNase A (marker for RNase)

ปิเปตสารละลาย RNase A (0.8 mg/ml) กับ dye (β-mercaptoethanol หรือ non β-mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเจือจาง 1000 เท่า

8. การเตรียมสารละลายสำหรับ Amylase activity gel staining

8.1) 1%Starch solution

ชั่ง Starch Rice Sigma มา 0.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 5 ml จากนั้นจึงเติมน้ำเดือดปริมาตร 25 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 30 ml

8.2) 1% Triton X-100 solution

ปิเปต Triton X-100 มา 1 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ปริมาตร 80 ml และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

8.3) สารละลาย Activity solution (10 mM Sodium acetate buffer pH 4.8 containing 0.2% starch)

Sodium acetate	0.82	g
1% Starch solution	20	ml

ละลาย Sodium acetate ในน้ำกลั่น 50 ml เติม 1% Starch solution 20 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 4.8 ก่อนปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

9. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion assay

9.1) Nutient Agar

ชั่ง Nutrient Agar 28 g เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไป clave ที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที

9.2) Nutrient Broth

ชั่ง Nutrient Broth 13 g เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไป clave ที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที