ภาคผนวก ก

เครื่องมือ สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

1. เครื่องมือ

1.1. ชุดสกัดดีเอ็นเอของพลาสมิด, QIAprep™ spin miniprep kit (Qiagen)

1.2. ชุดอุปกรณ์อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส, Polyacrylamide gel electrophoresis (Toyobo รุ่น Gelmate 2000)

1.3. ชุดอุปกรณ์โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส, Polyacrylamide gel electrophoresis unit (Atto รุ่น AE-6530 mPAGE)

1.4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectrophotometer

1.5. เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์, PCR

1.6. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า, DC Power supply รุ่น AE-8130 (ATTO)

1.7. เครื่องวิเคราะห์เจล, Gel Doc รุ่น Syngene Gene Genius

1.8. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมความเย็น, Refrigerated centrifuge (Sorvall)

1.9. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง, pH-meter รุ่น IQ 120 (LQ scientific instrument)

1.10. เครื่องชั่งวิเคราะห์, Analytical balance (Sartorius รุ่น BL 150)

1.11. ตู้ปลอดเชื้อ, Laminar airflow biosafety cabinet รุ่น NU-440 (Nuaire)

1.12. ตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า, Incubator shaker รุ่น Innova 4300

1.13. เครื่อง Electroporation และ 0.2 cm cuvettes

2. สารเคมี

2.1. สารเคมีทั่วไป

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ แบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้ดังนี้

2.1.1. Absolute alcohol, C_2H_5OH (Merk)

2.1.2. 40% Acrylamide/Bis solution 29:1 (Bio-Rad)

2.1.3. Agarose (Seakem)

2.1.4. Glacial acetic acid, CH_3COOH (Merk)

2.1.5. Bovine serum albumin, BSA (Biolab)

2.1.6. Bromophenol blue (Sigma)

2.1.7. Calcium chloride, $CaCl_2$ (CARLO ERBA)

2.1.8. Coomassie Brilliant blue R-250 (Fisher Biotech)

2.1.9. 1,4-Dithiothreitol, DTT (Merk)

2.1.10. Deoxyribonucleotide triphosphated, dNTPs (Fermentas)

2.1.11. Ethylendiaminetetraacetic acid, EDTA (USB)

2.1.12. Glycerol (Sigma)

2.1.13. Glycine, NH_2CH_2COOH (Merk)

2.1.14. Hydrochlolic acid,HCl (Fisher Chemical)

2.1.15. Isopropanol,$NaHCO_3$ (Sigma)

2.1.16. 6X loading dye (Fermentas)

2.1.17. Methanol, CH_3OH (CARLO ERBA)

2.1.18. Potassium phosphate, KH_2PO_4 (Sigma)

2.1.19. Potassium chloride, KCl (Sigma)

2.1.20. Sodium chloride, NaCl (CARLO ERBA)

2.1.21. Sodium dodecyl sulfate, SDS (CARLO ERBA)

2.1.22. Sodium hydroxide, NaOH (CARLO ERBA)

2.1.23. *N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyl-ethane-1,2-diamine, TEMED

2.1.24. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)

2.2. เอนไซม์และบัฟเฟอร์

2.2.1. เอนไซม์ *Pfu* polymerase และ 10x *Pfu* buffer (Fermentas)

2.2.2. เอนไซม์ *Dpn*I (Fermentas)

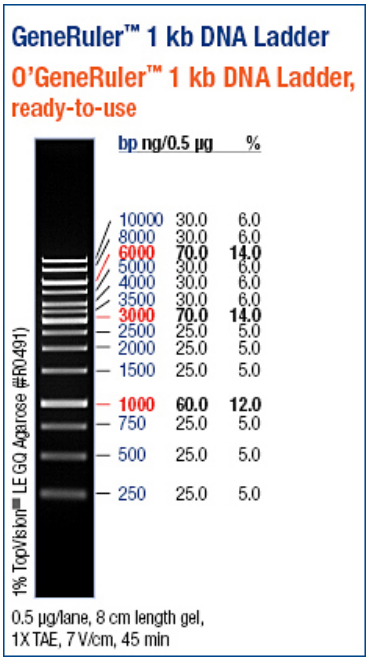
2.2.3. เอนไซม์ *Rha*I (Fermentas)

2.2.4. เอนไซม์ *Pme*I (Fermentas)

2.3. ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับ Agarose gel electrophoresis

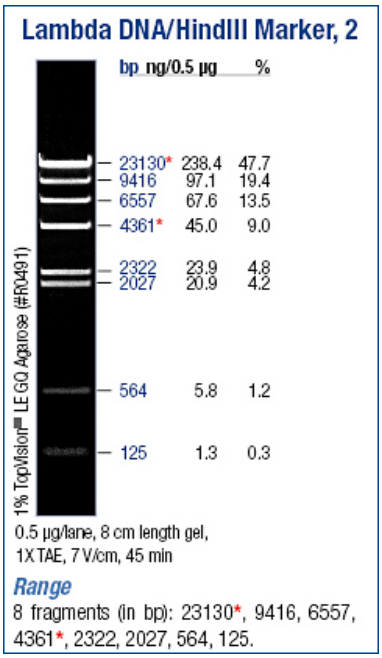
2.3.1. Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

ภาพภาคผนวกที่ 1



2.3.2. Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas)

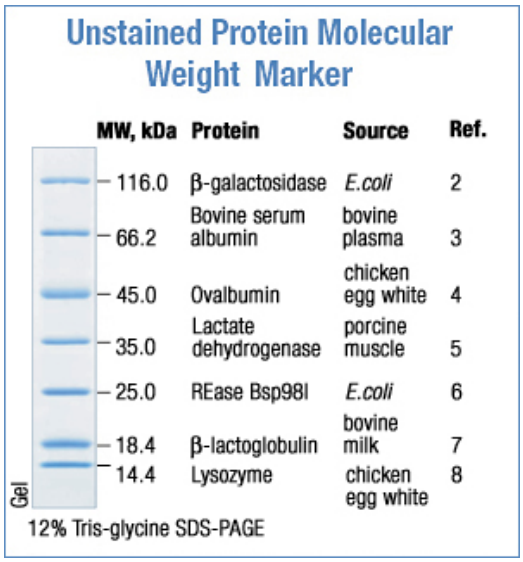
ภาพภาคผนวกที่ 2



2.4. โปรตีนมาตรฐานสำหรับโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส

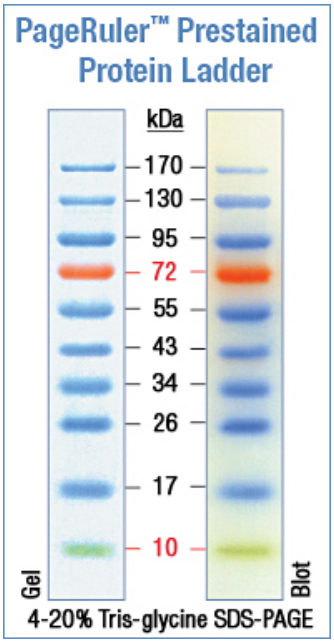
2.4.1. Unstained Protein Molecular Weight Marker(Fermentas)

ภาพภาคผนวกที่ 3



2.4.2. PageRuler™ Prestained Protein Ladder(Fermentas)

ภาพภาคผนวกที่ 4



3. การเตรียมสารเคมี

3.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.1.1. Luria-Bertani broth (LB broth)

เตรียมโดยละลาย LB broth Ultrapure (USB Corporation) 20 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.2. Luria-Bertani broth (LB agar)

เตรียมโดยละลาย LB broth Ultrapure (USB Corporation) 20 กรัม และ Agar 15 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาเทลง plate ในตู้ปลอดเชื้อ สำหรับอาหารแข็งที่มี zeocin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เตรียมโดย ผสมสารละลาย zeocin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส

3.1.3. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)

เตรียมโดยละลาย Yeast extract 10 กรัม และ Peptone 20 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย 10XDextrose 100 มิลลิลิตร

3.1.4. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD+Zeocin™)

เตรียมโดยละลาย Yeast extract 10 กรัม และ Peptone 20 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย 10XDextrose 100 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอให้อุณหภูมิเย็นลงที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเติม YPD+Zeocin™ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในสารละลาย

3.1.5. Buffered glycerol complex (BMGY)

เตรียมโดยละลาย Yeast extract 10 กรัม และ Peptone 20 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 700 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมส่วนผสมดังนี้

1 M โพแทสเซียม-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0	100	มิลลิลิตร
10X Yeast nitrogen base without amino acid(YNB)	100	มิลลิลิตร
500X Biotin	2	มิลลิลิตร
10X Glycerol	100	มิลลิลิตร

3.1.6. Buffered methanol complex (BMMY)

เตรียมโดยละลาย Yeast extract 10 กรัม และ Peptone 20 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 700 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมส่วนผสมดังนี้

1 M โพแทสเซียม-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0	100	มิลลิลิตร
10X Yeast nitrogen base without amino acid(YNB)	100	มิลลิลิตร
500X Biotin	2	มิลลิลิตร
30X Methanol	100	มิลลิลิตร

3.2. การเตรียมสารเคมีสำหรับ DNA agarose gel electrophoresis

3.2.1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 50X TAE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

Tris-base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.2.2. **การเตรียม Ethidium bromide ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลาย Ethidium bromide 500 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.3. **การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในการเตรียม** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

3.3.1. **สารละลาย 4X 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 + 0.4%SDS ปริมาตร 300 มิลลิลิตร**

Tris-base	54.49	กรัม
SDS	1.2	กรัม

ละลาย Tris-base และ SDS ในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 1 M HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 300 มิลลิลิตร

3.3.2. **สารละลาย 4X 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 + 0.4%SDS ปริมาตร 300 มิลลิลิตร**

Deionized water	9	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	6	มิลลิลิตร
50% Glycerol	50	มิลลิลิตร
10% SDS	20	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	5	มิลลิลิตร
1% (w/v) Bromophenol blue	10	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base และ SDS ในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 1 M HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 300 มิลลิลิตร

3.3.3. สารละลาย 5X Sample buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Tris-base	30	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.3.4. สารละลาย 10X Protein running buffer ปริมาตร 1 ลิตร

Tris-base	30	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.3.5. สารละลาย Destaining solution ปริมาตร 1 ลิตร

Methanol	100	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
Distilled water	800	มิลลิลิตร

3.3.6. สารละลาย Comasie brilliant blue stain ปริมาตร 1 ลิตร

Comasie brilliant blue R-250	1	กรัม
Methanol	100	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
Distilled water	800	มิลลิลิตร

3.3.7. การเตรียม 12% Separating gel 1 แผ่น

Deionized water	3,300	ไมโครลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8+4.0% SDS	1,900	ไมโครลิตร

40% Acrylamide	2,250	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

3.3.8. การเตรียม 4% Stacking gel 1 แผ่น

Deionized water	1,650	ไมโครลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8+4.0% SDS	625	ไมโครลิตร
40% Acrylamide	200	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	30	ไมโครลิตร
TEMED	3	ไมโครลิตร

3.4. การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytase

3.4.1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Glycine pH 2, 3 และ 4 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Glycine	7.507	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Glycine ในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 2,3 และ 4 ด้วย 1 M HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.4.2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Sodium acetate pH 4, 4.5, 5, 5.5 และ 6 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Sodium acetate	8.203	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Sodium acetate ในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 4, 4.5, 5, 5.5 และ 6 ด้วย 1 M Acetic acid ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.4.3. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M MOPs pH 6.5, 7 และ 7.5 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

MOPs	20.926	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย MOPs ในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 6.5, 7 และ 7.5 ด้วย 1 M NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.4.4. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris pH 7, 8 และ 9 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris	12.11	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Tris ในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 7, 8 และ 9 ด้วย 1 M HCl Acetic acid ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.4.5. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Glycine pH 10, 11 และ 12 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Glycine	7.507	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Glycine ในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH เป็น 4, 4.5, 5, 5.5 และ 6 ด้วย 1 M Acetic acid ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร