ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในการทดลอง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Luria-Bertani (LB) broth

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

ปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

Luria-Bertani (LB) agar

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

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 400 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงเทลงบนจานเลี้ยง (plate) ภายในตู้ปลอดเชื้อ เมื่ออาหารมีการแข็งตัวจึงนำไปเก็บภายในตู้แช่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

สารละลาย Glutathione elution buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM Glutathione (reduced form), pH 8.0)

1 M Tris-HCl, pH 8.0	2.5	ml
Glutathione (reduced form)	0.151	g

ละลายสารด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนได้ปริมาตร 50 ml จากนั้นจึงกรองสารละลายด้วยตัวกรอง (filter) ขนาด 0.22 μ (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำมาใช้งาน)

สารละลาย 6 M Guanidine hydrochloride 100 ml

Guanidine hydrochloride	57.3	g

ละลายผง Guanidine hydrochloride 57.3 g ในน้ำกลั่น 50 ml จากนั้นปรับปริมาตรจนได้ปริมาตร 100 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 10X Phosphate bufferred saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 2 mM KH2PO4) 1 L

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

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 600 ml ปรับ pH ด้วย 1 M HCl เป็น 7.4 จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 1 M Tris-HCl 1L

Tris base	121.1	g

ละลายผง Tris base 121.1 g ในน้ำกลั่น 800 ml ปรับให้สารละลายมีค่า pH ตามที่ต้องการด้วย concentrated HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 L

สารละลาย 1.5 M Tris-HCl/0.4% SDS, pH 8.8 250 ml

Tris base	45.41	g
SDS	1.0	g

ละลายสารด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงปรับ pH จนเท่ากับ 8.8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้มีปริมาตรเท่ากับ 250 ml

สารละลาย 0.5 M Tris-HCl/0.4% SDS, pH 6.8 250ml

Tris base	15.14	g
SDS	1.0	g

ละลายสารด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงปรับ pH จนเท่ากับ 6.8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้มีปริมาตรเท่ากับ 250 ml

สารละลาย SDS-Sample buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% Glycerol, 0.02% Bromphenol blue, 0.5 M DTT) 100 ml

2 M Tris-HCl (pH 6.8)	12.5	ml
SDS	10	g
50% Glycerol	5	ml
0.04% Bromphenol blue	52	ml
1 M DTT* (เติมก่อนใช้)	0.5	ml

สารละลาย 10X Running buffer 1 L (1X: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)

Tris base	30.3	g
Glycine	144	g
SDS	10	g

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 L

สารละลาย Lysis buffer (30 mM Tris, 2 M Thiourea, 7 M Urea, 4% CHAPS) 100 ml

Tris base	0.181	g
Thiourea	15.22	g
Urea	42.0	g
CHAPS	4.0	g

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 8.5 จากนั้นปรับปริมาตรจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 ml

สารละลาย Rehydration buffer (9 M Urea, 4% CHAPS, bromphenol blue) 25 ml

Urea	13.5	g

CHAPS	1.0	g
Bromophenol blue	50	µl

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรจนเท่ากับ 25 ml