

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris) basal medium

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	0.1	กรัมต่อลิตร
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.3	กรัมต่อลิตร
Sodium chloride (NaCl)	1.0	กรัมต่อลิตร
Ammonium chloride (NH_4Cl)	0.25	กรัมต่อลิตร
Thiamine	0.005	กรัมต่อลิตร
Glycerol	0.1	กรัมต่อลิตร
5-Fluorouracil (5-FU)	100	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH enrichment broth

Bovine Serum Albumin Fraction V	100	กรัมต่อลิตร
Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัมต่อลิตร
Magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัมต่อลิตร
Zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.04	กรัมต่อลิตร
Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.003	กรัมต่อลิตร
Iron sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5	กรัมต่อลิตร
Vitamin B_{12} (Cyanocobalamin)	0.002	กรัมต่อลิตร
Tween 80	12.5	กรัมต่อลิตร
5-Fluorouracil (5-FU)	100	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

1. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์กลุ่มที่ 1 (LR1 LR2 LR3) ส่วนประกอบต่าง ๆ มีดังนี้

10x PCR buffer	5	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl ₂	1.5	ไมโครลิตร
100 pmol primers LR1 LR2 LR3 (each)	0.5	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	40	ไมโครกรัม
dH ₂ O	29.75	ไมโครลิตร
Total	50	ไมโครลิตร

2. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์กลุ่มที่ 2 (LR4 LR5) ส่วนประกอบต่าง ๆ มีดังนี้

10x PCR buffer	5	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl ₂	1.5	ไมโครลิตร
100 pmol primers LR4 LR5 (each)	0.5	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	40	ไมโครกรัม
dH ₂ O	30.25	ไมโครลิตร
Total	50	ไมโครลิตร

3. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 (LR6 LR7 LR8) ส่วนประกอบต่าง ๆ มีดังนี้

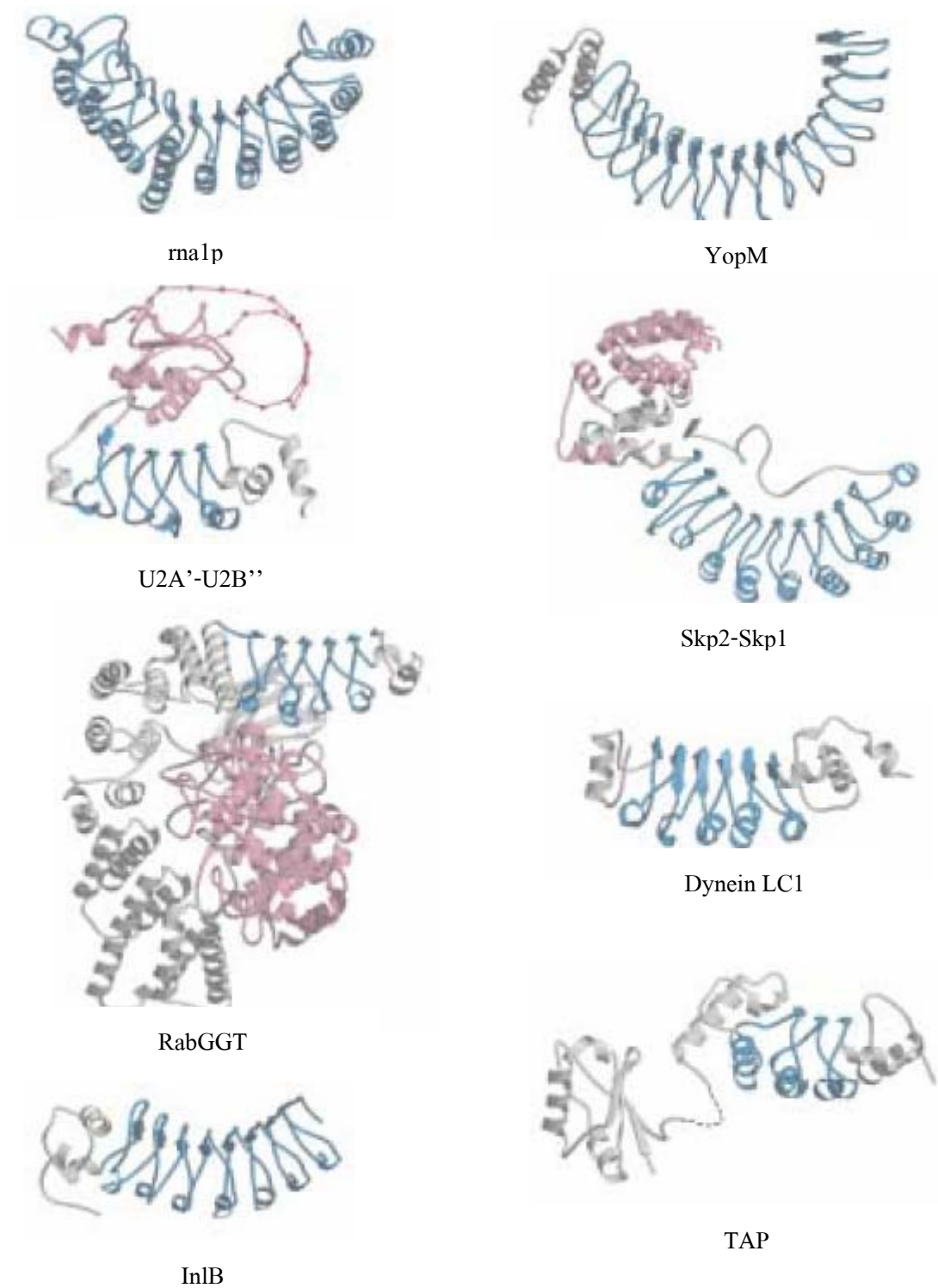
10x PCR buffer	5	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl ₂	1.5	ไมโครลิตร
100 pmol primers LR6 LR7 LR8 (each)	0.5	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	40	ไมโครกรัม
dH ₂ O	35.75	ไมโครลิตร
Total	50	ไมโครลิตร

หลังจากเตรียมส่วนประกอบทุกอย่างเรียบร้อยแล้วนำมาเข้าเครื่อง Thermocycler ที่มีการตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

Step ที่ 1	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 2 รอบ
Step ที่ 2	43 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Step ที่ 3	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Step ที่ 4	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	} 40 รอบ
Step ที่ 5	45 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Step ที่ 6	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Step ที่ 7	4 องศาเซลเซียส	∞	

รวมเวลาทั้งหมด 3 ชั่วโมง 47 นาที 57 วินาที

ภาคผนวก ค.



ภาพผนวกที่ 1 โครงสร้างของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่มีส่วน LRR
ที่มา: Kobe and Kajava (2001)

