

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Marine agar (MA)

เตรียมอาหาร 1000 มิลลิลิตร จะชั่งอาหาร MA มา 55.1 กรัม

Brain Heart Infusion Broth (BHIB) ผสม NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมอาหาร 1000 มิลลิลิตร

อาหาร BHI 37 กรัม

NaCl 15 กรัม

Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ผสม NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมอาหาร 1000 มิลลิลิตร

อาหาร BHI 37 กรัม

NaCl 15 กรัม

Agar 12 กรัม

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3 M Na acetate ($\text{CH}_3\text{CooNa}_2\text{H}_2\text{O}$), pH5.4

Molecular weight ของ $\text{CH}_3\text{CooNa}_2\text{H}_2\text{O}$ = 136.08

จาก $1 \text{ M} = \text{MW ของสาร} \times 1000$

ต้องการ 3 M คำนวนได้จากสูตร

$$n = W/M$$

$$3 = W/136.08$$

$$W = 408.24 \text{ กรัม}$$

เตรียม 1000 มิลลิลิตร ชั่ง $\text{CH}_3\text{CooNa}_2\text{H}_2\text{O}$ มา 408.24 กรัม

เตรียม 50 มิลลิลิตร ชั่ง $\text{CH}_3\text{CooNa}_2\text{H}_2\text{O}$ มา 20.412 กรัม

วิธีการเตรียม

ชั่ง Na acetate (NaOAc) มา 20.412 กรัม ใส่ลงในขวด SCHOTT DURAN ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 5 N HCl ให้ได้ pH 5.4 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตรในกระบอกตวง และปรับ pH อีกครั้งให้ได้ pH 5.4 แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² เป็นเวลา 15-20 นาที

0.5 M EDTA, pH 8

Molecular weight ของ EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) = 372.24

จาก $1 \text{ M} = \text{MW ของสาร} \times 1000$

ต้องการ 0.5 M คำนวนได้จากสูตร

$$n = W/M$$

$$0.5 = W/372.24$$

$$W = 186.12 \text{ กรัม}$$

เตรียม 1000 มิลลิลิตร ชั่ง EDTA มา 186.12 กรัม

เตรียม 100 มิลลิลิตร ชั่ง EDTA มา 18.612 กรัม

วิธีการเตรียม

ชั่ง EDTA มา 18.612 กรัม ใส่ลงในขวด SCHOTT DURAN ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 5 N NaOH ให้ได้ pH 8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตรในกระบอกตวง และปรับ pH อีกครั้งให้ได้ pH 8 แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² เป็นเวลา 15-20 นาที

1 M Tris-HCl, pH 8

Molecular weight ของ Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$) = 121.14

จาก $1\text{ M} = \text{MW ของสาร} \times 1000$

ต้องการ 1 M คำนวณได้จากสูตร

$$n = W/M$$

$$1 = W/121.14$$

$$W = 121.14 \text{ กรัม}$$

เตรียม 1000 มิลลิลิตร ชั่ง Tris-base มา 121.14 กรัม

เตรียม 100 มิลลิลิตร ชั่ง Tris-base มา 12.114 กรัม

วิธีการเตรียม

ชั่ง Tris-base มา 12.114 กรัม ใส่ลงในขวด SCHOTT DURAN ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 5 N HCl ให้ได้ pH 8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตรในกระบอกตวง และปรับ pH อีกครั้งให้ได้ pH 8 แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² เป็นเวลา 15-20 นาที

TE buffer

10 mM Tris-HCl, pH 8

1 mM EDTA, pH 8

เตรียม TE buffer 50 มิลลิลิตร

1 M Tris-HCl 500 ไมโครลิตร

0.5 M EDTA 100 ไมโครลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² เป็นเวลา 15-20 นาที

ฟีนอล (C_6H_5OH) (ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์)

เก็บในขวดสีชาและไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

คลอโรฟอร์ม

เก็บในขวดสีชาและไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ไอโซโพรพานอล

เก็บในขวด SCHOTT DURAN ขนาด 100 มิลลิลิตร และไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5 M NaCl

Molecular weight ของ NaCl = 58.44

ต้องการ 5 M คำนวณได้จากสูตร

$$n = W/M$$

$$5 = W/58.44$$

$$W = 292.20 \text{ กรัม}$$

เตรียม 1000 มิลลิลิตร ชั่ง NaCl มา 200 กรัม

เตรียม 50 มิลลิลิตร ชั่ง NaCl มา 14.61 กรัม

วิธีการเตรียม

ชั่ง NaCl มา 12.114 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตรในกระบอกตวง แล้วใส่ลงในขวด SCHOTT DURAN ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² เป็นเวลา 15-20 นาที

TEN buffer

0.1 M NaCl

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

เตรียม TEN buffer 50 มิลลิลิตร

5 M NaCl 1 มิลลิลิตร

1 M Tris-HCl 500 ไมโครลิตร

0.5 M EDTA 100 ไมโครลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² เป็นเวลา 15-20 นาที

RNase A (10 mg/ml)

ชั่ง RNase A 10 มิลลิกรัมในลงในหลอดที่มีโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 10 มิลลิโมล (pH เท่ากับ 5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ Tris-Cl ความเข้มข้น 1 โมลลาร์ ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ก่อนเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

proteinase K (20 mg/ml)

ชั่ง proteinase K 200 มิลลิกรัมใส่ลงในหลอดที่มี 50 mM Tris pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

STE buffer

0.1 M NaCl

50 mM Tris-HCl, pH 7.5

1 mM EDTA

เตรียม STE buffer 20 มิลลิลิตร

5 M NaCl 0.4 มิลลิลิตร

1 M Tris-HCl 1 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA 40 ไมโครลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² เป็นเวลา 15-20 นาที

SDS 20 เปอร์เซนต์ (100 มิลลิลิตร)

ชั่ง SDS 20 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตรในกระบอกตวง และไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ค

สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

น้ำกลั่น (ddH₂O)

น้ำกลั่นที่ใช้เป็นน้ำกลั่นที่ถูกกลั่น 2 ครั้ง (double distilled water) เตรียมใส่ขวด SCHOTT DURAN ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว² เป็นเวลา 15-20 นาที

10x buffer

Thermophilic DNA Poly 10x Buffer ที่ใช้เป็นของ Promega ความเข้มข้นของ 10x buffer ที่ใช้จริงในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะต้องเป็น 1 เท่าต่อ 1 reaction รหัสสินค้า M190G (14864552)

dNTP

dNTP ที่ใช้เป็นของ BIORON ซึ่งประกอบไปด้วยหลอด dGTP, dCTP, dTTP และ dATP แยกกัน แต่ละหลอดมีความเข้มข้น 20 mM และมีปริมาตร 200 ไมโครลิตร

การเตรียม 2 mM dNTP 250 ไมโครลิตร

ดูด ddH₂O ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 150 ไมโครลิตรลงไปในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม dGTP, dCTP, dTTP และ dATP อย่างละ 25 ไมโครลิตรลงในหลอดและผสมให้เข้ากันก่อนนำมาใช้

รหัสสินค้า : 110023 (dATP), 110025 (dCTP), 110027 (dGTP) และ 110029 (dTTP)

MgCl₂

MgCl₂ ที่ใช้เป็นของ Promega ความเข้มข้น 25 mM รหัสสินค้า A351H (15913102)

Taq polymerase

Taq polymerase ที่ใช้เป็นของ Promega (500U)

6x loading buffer

6x loading buffer ที่ใช้เป็นของ Bioron ประกอบไปด้วย Bromphenol blue sodium Salt 0.25 เปอร์เซ็นต์, Xylene cyanol FF 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ Ficol 400 15 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเคลื่อนที่ของ loading buffer ในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ สีฟ้าของ Bromphenol blue sodium Salt และสีม่วงของ Xylene cyanol FF จะมีอัตราการเคลื่อนที่บนเจลประมาณ 300 และ 4,000 คู่เบส ของดีเอ็นเอสายคู่เส้นตรง ตามลำดับ

รหัสสินค้า : 306205

5x TBE buffer

จาก 10x TBE buffer (1 L) ประกอบด้วย

Tris base	107.80 กรัม
Boric acid	~ 55 กรัม
Disodium EDTA•2H ₂ O	7.44 กรัม

5x TBE buffer (1 L) ประกอบด้วย

Tris base	53.9 กรัม
Boric acid	~ 27.5 กรัม
Disodium EDTA•2H ₂ O	3.72 กรัม

เตรียม 5x TBE buffer 200 มิลลิลิตร

Tris base	10.78 กรัม
Boric acid	~ 5.5 กรัม
Disodium EDTA•2H ₂ O	0.744 กรัม

วิธีการเตรียม

ชั่ง Tris base 10.78 กรัม และ Disodium EDTA•2H₂O 0.744 กรัม ใส่ลงในขวด SCHOFT DURAN ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Boric acid ลงไปประมาณ 3 กรัม เติมน้ำกลั่น ลงไปประมาณ 170 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง stirrer (รุ่น RH basic KT/C, Serial Number : 05012511, IKA, Brasil) ปรับ pH ให้ได้ 8.3 ด้วย boric acid จากนั้นเติมน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตรในกระบอกตวง ปรับ pH อีกครั้งด้วย boric acid เพื่อให้ได้ pH 8.3 และไม่ต้องนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

เจลอะกาโรส

เจลอะกาโรสที่ใช้เป็น Molecular Biology Grade ของ Bioron ซึ่งไม่มี DNase และ RNase activity สามารถแยกขนาดของ DNA fragment ได้ตั้งแต่ 50– 50,000 คู่เบส
รหัสสินค้า : 604005

ภาคผนวก ง

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดย
ดัดแปลงจากวิธีการของ Sambrook *et al.* (1998)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ค่าดูดกลืนแสงที่ 260 nm	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)
KKU 46001	0.053	530
KKU 46002	0.016	160
KKU 46003	0.023	230
KKU 46005	0.017	170
KKU 46006	0.016	160
KKU 46007	0.016	160
KKU 46008	0.035	350
KKU 46009	0.026	260
KKU 46010	0.014	140
KKU 47001	0.020	200
KKU 47002	0.016	160
KKU 47003	0.043	430
KKU 47005	0.029	290
KKU 47006	0.028	280
KKU 47011	0.020	200
KKU 47012	0.035	350
KKU 47014	0.023	230
KKU 47015	0.015	150
KKU 47016	0.032	320
KKU 47017	0.024	240
KKU 47018	0.030	300
KKU 47019	0.034	340
KKU 47020	0.026	260
KKU 47021	0.010	100
KKU 47022	0.021	210
KKU 47023	0.024	240

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดย
ดัดแปลงจากวิธีการของ Sambrook *et al.* (1998) (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ค่าดูดกลืนแสงที่ 260 nm	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ l)
KKU 47024	0.024	240
KKU 47025	0.025	250
KKU 47026	0.036	360
KKU 47027	0.018	180
KKU 47028	0.021	210
KKU 47030	0.020	200
KKU 47032	0.017	170
KKU 47033	0.014	140
KKU 47034	0.034	340
<i>A. hydrophila</i>	0.039	390
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	0.036	360