ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 5 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN, Germany
QIAGEN Gel Extraction Kit	QIAGEN, Germany
QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN, Germany
Restriction enzymes	New England Biolabs, USA
Absolute Ethanol	BDH Anala^{R}, England
Lamda DNA/Hin*dIII* Marker	Promega, USA
Agarose	USA, Spain
Phenol, chloroform	USA, Spain
X-gal, IPTG	USA, Spain

2. ครุภัณฑ์

ตารางที่ 6 ครุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	ผู้ผลิต
PCR Machine	ICyler Thermal Cycler	BIO-RAD, USA
Image Analyzer	Image Master VDS	Pharmacia Biotech
UV-Transilluminator	2011 MACROVUE	LKB Bromma, Sweden
Larminar flow	BS 5726 NSF 49	Clean Air, USA
Block heater	STUART	Scientific Industries, USA
Water Bath shaker	Ace-80	TAIYO, Japan
Centrifuge	SORVALL RC-26 Plus	DuPont, USA
Autoclave	UM-65L VA	United Mechanical, Thailand
Refrigerated Super Speed	1 K 15	Sigma, Germany
Hot air oven	WTCbinder FD240	TuttLingen, Germany
Spectrophotometer	UV-2501PC	Shimadzu, Japan
ตู้แช่แข็ง -20°C	SF-C69	SANYO, Thailand

ตารางที่ 6 ครุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	ผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	PR 503 DeltaRange	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	BP 3100 S	Sartorius, Germany
อุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซิส	GelMate 2000	TOYOBO, Japan

ภาคผนวก ข

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1.1 LB medium

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแคลลัสพืชไข่เน่า

2.1 การเตรียม STOCK

2.1.1 STOCK I

NH_4NO_3	41.25	กรัม
$K NO_3$	47.50	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	11.00	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	500	มิลลิลิตร

2.1.2 STOCK II

$MgSO_4.7H_2O$	9.25	กรัม
KH_2PO_4	4.25	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	500	มิลลิลิตร

2.1.3 STOCK III

$FeSO_4.7H_2O$	0.6950	กรัม
$Na_2.EDTA.2H_2O$	0.9325	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	250	มิลลิลิตร

2.1.4 STOCK IV

KI	0.0830	กรัม
H_3BO_3	0.6200	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	2.2300	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.8600	กรัม

$Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.0250 กรัม

$CuSO_4.5H_2O$ 0.0025 กรัม

$CoCl_2.6H_2O$ 0.0025 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร

2.1.5 STOCK V

Nicotinic acid 0.0050 กรัม

Pyridoxin HCl 0.0050 กรัม

Thiamine HCl 0.0010 กรัม

Glycine 0.2000 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2.1.6 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

นำ 2,4-D 0.01 กรัม มาละลายใน 50% Ethanol แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2.1.7 BAP (6-benzyl-laminopurine)

นำ BAP 0.02 กรัม มาละลายใน 1 N NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร

2.2 วิธีการเตรียมอาหารสูตร ½ MS สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสไข่เน่า

STOCK I	10	มิลลิลิตร
STOCK II	10	มิลลิลิตร
STOCK III	5	มิลลิลิตร
STOCK IV	1	มิลลิลิตร
STOCK V	10	มิลลิลิตร
2,4-D	10	มิลลิลิตร
BAP	20	มิลลิลิตร
น้ำตาล	30	กรัม
Agar	8	กรัม
Myo-inosital	0.1	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 5.7

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 28 นาที

3. การเตรียมสารเคมี

3.1 การเตรียม 1% Agarose gel

นำ Agarose 1 กรัม เติม 1x TAE buffer 100 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียม 0.8% Agarose gel

นำ Agarose 0.8 กรัม เติม 1x TAE buffer 100 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.3.1 สารละลาย I (25 mM Tris.HCl/10 mM EDTA/50 mM glucose)

1 M Tris HCl (pH 8.0)	2.5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2.0	มิลลิลิตร
กลูโคส (เดกโตรส)	0.9	กรัม
น้ำกลั่น	95.5	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 สารละลาย II (0.2 N NaOH/0.2% SDS)

6 N NaOH	0.3	มิลลิลิตร
10% SDS	0.9	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ	7.8	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

<u>การเตรียม 6 N NaOH</u>

NaOH	120	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

<u>การเตรียม 10% SDS</u>

SDS	10	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ	90	มิลลิลิตร

3.3.3 สารละลาย III

5 M K-acetate	60	มิลลิลิตร
Acetic acid	11.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	28.5	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>การเตรียม 5 M K-acetate</u>

K-acetate (CH_3COOK)	63.8	กรัม

น้ำกลั่น	130	มิลลิลิตร

3.3.4 3 M NaOAC

1 M NaOAC	49.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 4.8

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อให้ครบ 200 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 TE pH 8.0 (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA)

1 M Tris HCl (pH 8.0)	1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	98.8	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 RNase A 20 µg/ml ใน TE (pH 8.0)

RNase 1 mg/ml	100	ไมโครลิตร
TE (pH 8.0) ที่ปลอดเชื้อ	4.9	มิลลิลิตร

นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6 RNase A 10 µg/ml ใน TE (pH 8.0)

RNase 100 mg/ml	0.01	กรัม
TE (pH 8.0) ที่ปลอดเชื้อ	100	ไมโครลิตร

นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.7 50x TAE buffer

Tris	121.0	กรัม
กรดอะซิติก	28.55	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	50.0	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ	500	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.8 1x TAE buffer

50x TAE buffer	10	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.9 20% PEG ใน 1 M NaCl

20% PEG	100	มิลลิลิตร
1 M NaCl	100	มิลลิลิตร

<u>การเตรียม 20% PEG</u>

PEG	20	กรัม
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	80	มิลลิลิตร

<u>การเตรียม 1 M NaCl</u>

1 M NaCl	5.84	กรัม
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	95.16	มิลลิลิตร

3.10 Isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG)

เตรียม Stock โดยสารละลาย IPTG 20 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเมมเบรน 0.22 ไมโครลิตร และเก็บไว้ในห่อ foil ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.11 5 Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal)

ละลาย X-gal 20 มิลลิกรัม ในสารละลาย Dimethylformamide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในห่อ foil ที่ -20 องศาเซลเซียส

4. การคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm มีค่าเท่ากับ 0.012

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm มีค่าเท่ากับ 0.008

ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอคือ

OD_{260} = 1 เท่ากับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 µg/ml

วัดได้ = 0.012 เท่ากับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ $\frac{50 \times 0.012 \times 100}{1}$

= 60 µg/ml

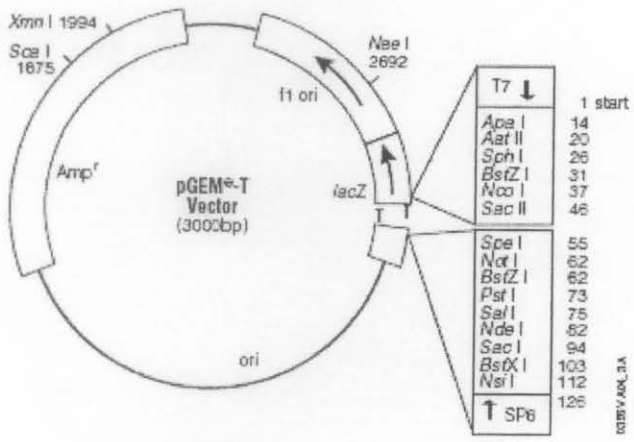
ดังนั้น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ความเข้มแสง 260 nm คือ 0.06 µg/ml หรือ 60 ng

และคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้คือ 0.012 / 0.008 = 1.5

หมายเหตุ คุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีคือ 1.65-1.85

ภาคผนวก ค

แผนที่ของดีเอ็นเอพาหะ (vector)



รูปที่ 17 แผนที่ของพลาสมิด pGEM T-easy vector (http://life.nthu.edu.tw/)

ภาคผนวก ง

Agarose Gel Electrophoresis

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟไรซิส เป็นกระบวนการที่ใช้แยก DNA ของสารตัวอย่างโดยใช้ไฟฟ้าเพื่อตรวจหาองค์ประกอบของ DNA ในสารตัวอย่างเพื่อประโยชน์ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของสารตัวอย่าง

อุปกรณ์ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟไรซิส ประกอบด้วย

- เครื่อง Electrophoresis และ power supply
- เจลที่ใช้ทดสอบ
- Sample combs
- Electrophoresis buffer ซึ่งโดยปรกติจะใช้ Tris-acetate-EDTA (TAE) หรือ Tris-borate-EDTA (TBE)
- Loading buffer ซึ่งประกอบด้วยสารละลายบางชนิด
- Ethidium bromide
- Transilluminator

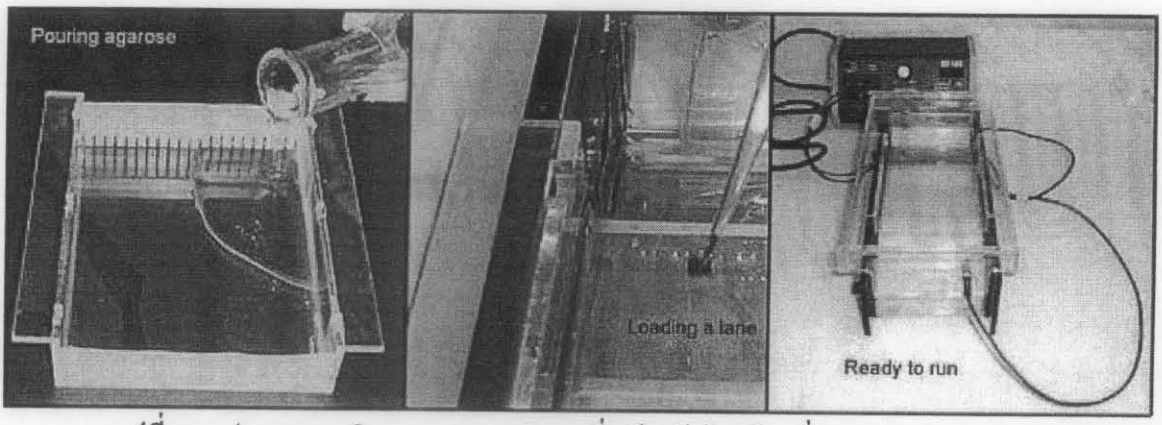
ขั้นตอนการทำอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟไรซิส มีดังนี้

1. ขั้นตอนการรินเจล

นำผง agarose ผสมกับ electrophoresis buffer จากนั้นก็นำเข้า microwave เพื่อให้ความร้อนจนหลอมเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ง่ายจะใช้ Ethidium bromide ความเข้าข้น 0.5 ug/ml ใส่เข้าไปในเจล จากนั้นทำให้เย็นถึงอุณหภูมิประมาณ 60 องศเซลเซียส จึงเทสารที่ได้ลงใน sample comb และจึงปล่อยให้เย็นตามอุณหภูมิห้องหลังจากที่เจลแข็งตัว เจลจะอยู่ในลักษณะคล้ายพลาสติก

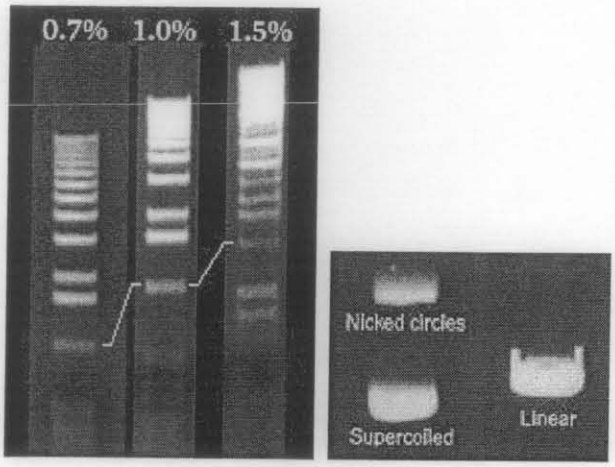
2. ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยไฟฟ้า

นำเจลที่ได้ไปวางบนถาดและใส่ลงไปในเครื่องelectrophoresisในแนวตั้ง และใส่สาร DNA ตัวอย่างลงไปด้วยจากนั้นก็ให้กระแสไฟเข้าในเครื่อง DNA ก็จะมีการเคลื่อนย้ายไปยังขั้ว anode ตามน้ำหนักโมเลกุล



รูปที่ 18 รูปแสดงการรินเจลและการนำเจลที่แห้งแล้วไปเข้าเครื่อง electrophoresis

ระยะทางที่ DNA ได้เคลื่อนไปในเจลสามารถเห็นได้ชัดจากการย้อมสี และส่วนต่าง ๆ ของ DNA ที่แยกออกมาจะมีค่า ตั้งแต่ 300 – 4000 bpจากนั้นก็จะได้ภาพการแยกที่ชัดเจน ส่วนของ DNA ที่เคลื่อนไปใน agarose gels เป็นระยะทางต่าง ๆ แปรผกผันกับ log10 ของน้ำหนักโมเลกุลของมัน นั่นคือถ้าคุณ plot กราฟระหว่างส่วนต่าง ๆ ของ DNA ที่เคลื่อนที่ได้กับกับ log10 ของน้ำหนักโมเลกุล จะได้แนวโน้มของแต่ละจุดคล้าย ๆ เส้นตรง จุดนี้มีความสำคัญในการหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละส่วนของ DNA ใน agarose gels ที่ต้องการ

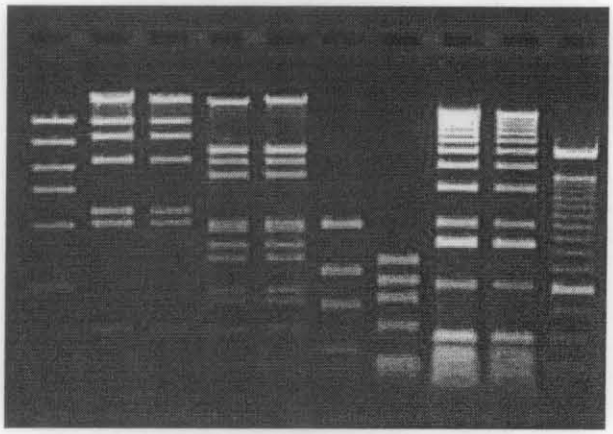


รูปที่ 19 แสดงภาพถ่ายอะกาโรสเจล ลักษณะของ band และ lane ที่เกิด

ภาพที่เกิดขึ้นจาก agarose gels ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. ความเข้มข้นของ agarose gel
2. ค่า voltage
3. ตัว buffer ใน electrophoresis

หลังจากที่เราทำกระบวนการ Agarose gel electrophoresis เรียบร้อยแล้ว เราจะได้ภาพถ่ายของ DNA ที่เคลื่อนไปในagarose gels เป็นระยะทางต่าง ๆออกมาได้ดังรูป



รูปที่ 20 รูปแสดงภาพถ่ายอะกาโรสเจลหลังผ่านกระบวนการ electrophoresis