

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เคมีภัณฑ์ ครุภัณฑ์ และวัสดุภัณฑ์

รายชื่อเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

Chemicals	Sources
1. Absolute Ethanol	BDH, England
2. Tris-hydrochloride	Promega, U.S.A.
3. Phenol	BDH, England
4. Agarose	USB, Spain
5. X-gal (5 Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)	USB, U.S.A.
6. IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside)	USB, U.S.A.
7. Ampicillin	Sigma, U.S.A.
8. Polyethylene glycol (PEG) 6000	Fluka, Switzerland
9. EDTA	Fluka, Switzerland
10. Urea	Fluka, Switzerland
11. Acrylamide	Fluka, Switzerland
12. Ethidium bromide	Sigma, U.S.A
13. Sodium dodecyl sulfate	Fluka, Switzerland
14. Sodium hydroxide	BDH, England
15. Ammonium acetate	Merck, USA
16. Sodium acetate	Merck, USA
17. Potato dextrose agar	Himedia, India
18. Yeast extract	Himedia, India
19. Tryptone	Himedia, India
20. Agar	USB, U.S.A.
21. Chloroform	Merck, USA
22. N-N'-Methylenebisacrylamide	Fluka, Switzerland
23. Ammonium persulphate	Promega, U.S.A
24. Glycerol	Sigma Chemicals, U.S.A

ครุภัณฑ์

Instrument	Model	Sources
1. PCR Machine	Icycler Thermal Cycler	Bio-rad, U.S.A.
2. Image Analyzer	Image Master VDS	Pharmacia Biotech
3. UV-Transilluminator	2011 Macrovue	LKB Bromma, Sweden
4. Hybridization Oven	Hemovest220	Hybrid limited, UK
5. Laminar flow	Europene, R.D.	Flufrance, France
6. Block heater	STUART	Scientific Industries, U.S.A
7. Refrigerated Super Speed	1 K 15	Sigma, Germany
8. Hot air oven	FD240	WTC binder, Germany
9. Electrophoresis sets	GelMate 2000	Toyobo, Japan
10. Balance	BP 3100 S	Sartorius, Germany
11. Balance	PR 503 DelaRange	Mettler Toledo, Switzerland
12. pH meter	LE 409	Mettler Toledo, Switzerland
13. Spectrophotometer	UV-2501PC	Shimadzu, Japan
14. Incubator Shaker	PSYCROTHERMTM	New Brunswick , U.S.A.
15. Water bath shaker	Ace-80	Taiyo. Japan
16. Vortex Mixer	G-560E	Scientific Industries, U.S.A
17. Autoclave	UM-65L VA	United Mechanical, Thailand

ภาคผนวก ข
วัสดุภัณฑ์

วัสดุภัณฑ์

Materials	Model	Source
1. Nylon membrane	Nytran supercharge	Schleicher&Schuell
2. Filter	Gel-blotting papers	Schleicher&Schuell
3. Thermal film	Kodak Trix-pan400	Boehringer Mannheim, Germany
4. Autoradiography film	Hyperfilm ECL	Amersham phamacia
5. X-ray cassette	Hypercassette	Amersham phamacia

ภาคผนวก ค
สารละลายธาตุอาหาร

1. สารละลายธาตุอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงพืช (Gregorio et al., 1997)

ตารางที่ 15 การเตรียมสต็อกสารละลายธาตุอาหาร

Element	Reagent (AR grade)	Preparation (g/4 l solution)
Macronutrient		
N	Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	365.6
P	Sodium phosphate, monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	142.4
K	Potassium sulfate (K_2SO_4)	285.6
Ca	Calcium chloride, dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	469.4
Mg	Magnesium sulfate, 7-hydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1,296.0
Micronutrient		
	Dissolve each reagent separately and mix in 2 l distilled water then add 200 ml H_2SO_4 and make up volume to 4 l.	
Mn	Manganous chloride, 4-hydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	6.000
Mo	Ammonium molybdate, 4-hydrate [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]	0.296
Zn	Zinc sulfate, 7-hydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.140
B	Boric acid (H_3BO_3)	3.736
Cu	Cupric sulfate, 5-hydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.124
Fe	Ferric chloride, 6-hydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	30.800
	Citric acid, monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	47.600

ภาคผนวก ง

สารละลายปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับการแยกสกัด DNA และการโคลนยีน

สารละลายปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับการแยกสกัด DNA และการโคลนยีน

1. Solution I (25mM Tris-HCl/10 mM EDTA/50 mM glucose)

1M Tri-HCl (pH 8.0)	2.5 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2.0 ml
Glucose (dextrose)	0.9 g
dH ₂ O	95.5 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. Solution II (0.2 N NaOH/ 0.2 % SDS)

6 N NaOH	0.3 ml
10 % SDS	0.9 ml
dH ₂ O (autoclaved)	7.8 ml
เก็บที่อุณหภูมิห้อง	

3. Solution III

5 M potassium acetate	60.0 ml
Acetic acid	11.5 ml
dH ₂ O	28.5 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

4. 3 M Sodium acetate pH 4.8

Sodium acetate	49.2 g
----------------	--------

เติม H₂O ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ml ปรับ pH 4.8 ด้วย HCl นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

5. 10 M Ammonium acetate

Ammonium acetate	77 g
------------------	------

เติม H₂O ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

6. TE (pH 8.0) (10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA)

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.2 ml
dH ₂ O	98.8 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

7. 10 mg/ml RNase A in TE (pH 8.0)

RNase A	100 mg
TE (pH 8.0) autoclaved	10 ml

ต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลานาน 10 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

8. Extraction Buffer (100 mM Tris-HCl/50 mM EDTA/500 mM NaCl/10 mM Mercaptoethanol)

1M Tris-HCl (pH 8.0)	10 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	10 ml
NaCl	2.992 g
14.3 Mercaptoethanol	70 µl

เติมน้ำปราศจากไอออนให้ปริมาตรครบ 100 ml กรองสารผ่านกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ขนาด 0.22 micron) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

9. 1.5 M NaCl

NaCl	8.76 g
H ₂ O	100 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

10. 1.5 M NaCl in 13 % PEG 6000

PEG 6000	13 g
1.5 M NaCl	100 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

11. 20X SSC

NaCl	175.3 g
Trisodium citrate dehydrate	88.2 g
dH ₂ O	1000 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

12. 2X SSC

20X SSC	10 ml
dH ₂ O (autoclaved)	90 ml

13. Denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)

6 N NaOH	8.33 ml
NaCl	8.77 g

เติม H₂O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

14. Neutralizing solution (0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1 M NaCl)

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	50 ml
NaCl	5.84 g

เติม H_2O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

15. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA 18.6 g

ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH และเติม H_2O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

16. 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

Tris base 12.114 g

ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH และเติม H_2O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

17. 10 % SDS

SDS 10 g

dH_2O 100 ml

นึ่งฆ่าเชื้อและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

18. 1 M MgCl

$\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20.33 g

dH_2O 100 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

19. Hybridization buffer

NaCl 0.29 g

Blocking reagent 0.4 g

Hybridization buffer 10 ml

ผสมสารให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-2 ชั่วโมง บน magnetic stirrer นำเอาสารละลาย

ไปใช้ได้ทันทีหรือเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

20. Primary wash buffer (1 liter)

Urea 120 g

SDS 1 g

0.5 M Na phosphate pH 7.0* 100 ml

NaCl 8.7 g

1 M MgCl_2 1 ml

Blocking reagent 2 g

* 0.5 M Na phosphate สามารถเตรียมโดยใช้ sodium dihydrogen phosphate (monobasic, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) และปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย NaOH

สาร primary wash buffer สามารถเก็บได้นานกว่า 1 สัปดาห์ขึ้นไปโดยเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 °C

21. Secondary wash buffer- working dilution

Dilute stock 1:20 และเติม 1 M MgCl_2 ปริมาตร 2 ml/l เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 mM magnesium ในสารละลาย buffer ไม่ควรเก็บ buffer นี้ไว้ควรใช้ให้หมด

ภาคผนวก จ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ยาปฏิชีวนะ สารละลาย IPTG และ X-gal

I. Media

1. LB medium

Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g

เติม H₂O ให้ปริมาตรครบ 1 liter นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. LB agar

Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

เติม H₂O ให้ปริมาตรครบ 1 liter นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

II. Antibiotic

1. Ampicillin stock solution 100 mg/ml

Ampicillin anhydrous	100 mg
dH ₂ O ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	1 ml

ละลายและกรองผ่านกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ขนาด 0.22 μ m) เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C
ความเข้มข้นสุดท้ายของ ampicillin ใน LB medium คือ 100 μ g/ml

III. IPTG and X-gal solution

1. Isopropyl thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) 10 mg/ml

IPTG	0.01 g
------	--------

เติม dH₂O ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ml กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 micron
เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

2. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) 10 mg/ml

X-gal	0.01 g
-------	--------

เติม dimethyl formamide ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

ใน LB agar plate จะมี ampicillin ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ เติม IPTG ปริมาตร $100\text{ }\mu\text{l}$ และเติม X-gal ปริมาตร $50\text{ }\mu\text{l}$

ภาคผนวก จ
สารละลายในปฏิกิริยาสำหรับอิเล็กโตรฟรีซิส

สารละลายในปฏิกิริยาสำหรับเทคนิค agarose gel electrophoresis

1. 50X TAE buffer

Tris base	121.0 g
Acetic acid	28.55 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	50.00 ml

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2. 1X TAE buffer

50X TAE buffer	10 ml
dH ₂ O	490 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3. Gel-loading buffer

Bromophenol blue	25 mg
Xylene cyanol	25 mg
Sucrose	4 g

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

4. Ethidium bromide (10 mg/ml)

Ethidium bromide	1 g
------------------	-----

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml

สารละลายในปฏิกิริยาสำหรับเทคนิค SDS-PAGE

1. 30 % Acrylamide, 0.8 % Bis-acrylamide

Acrylamide	30 g
Bis-acrylamide	0.8 g

เติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. 1 M Tris.HCl pH 6.8

Tris.HCl	12.114 g
----------	----------

เติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 ด้วย 6N HCl

3. 1 M Tris.HCl pH 8.8

Tris.HCl	12.114 g
----------	----------

เติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml และปรับ pH ให้เท่ากับ 8.8 ด้วย 6N HCl

4. SDS running buffer

Tris.HCl	3 g
Glycine	14.4 g
SDS	1 g

เติมน้ำปราศไออนจากให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. 1 % Coomassie Brilliant Blue R-250

Coomassie Brilliant Blue	2 g
--------------------------	-----

เติมน้ำปราศจากไออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6. Staining solution

1 % Coomassie Brilliant Blue R-250	62.5 ml
Methanol	250 ml
Acetic acid (glacial)	50 ml

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

7. Destaining solution I

Methanol	500 ml
Acetic acid (glacial)	100 ml

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. Destaining solution II

Methanol	50 ml
Acetic acid (glacial)	70 ml

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. 10 % SDS

SDS	10 g
-----	------

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121°C

เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

10. การเตรียมเจล (สำหรับเจลที่มีขนาด 10 cm)

Components	3.6 % Acrylamide (stacking gel)	12 % Acrylamide (separating gels)
30 % Acrylamide, 0.8 % Bis-acrylamide	0.67 ml 0.63 ml	4 ml -
1 M Tris.HCl pH 6.8	-	3.75 ml
1 M Tris.HCl pH 8.8	0.05 ml	0.1 ml
10 % SDS	3.65 ml	2.2 ml
H ₂ O	20 µl	20 µl
TEMED	50 µg	50 µg
Ammonium persulfate	5 ml	10 ml
Final volume		

สารละลายในปฏิกิริยาสำหรับเทคนิค electroblotting

1. Upper buffer

Tris base	3.03 g
SDS	0.25 g
Tricine	4.48 g

เติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 250 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.25 ด้วย

NaOH

2. Lower buffer

Tris base	6.06 g
SDS	0.25 g

เติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 250 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.5 ด้วย

NaOH

3. Blotting buffer

CAP	2.213 g
Methanol	100 ml

เติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 liter and pH was adjusted to 11.0 with 6N NaOH

4. 10 X Staining solution

Ponceau S	2 g
-----------	-----

Sulfosalicylic acid 30 g

100% TCA 30 ml

เติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml

ภาคผนวก ข
วิธีใช้ชุดสำเร็จรูป

I. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูปของ QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit

- 1) ตัวอย่างที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอมาชั่งน้ำหนัก โดยน้ำหนักต้องไม่เกิน 100 mg
- 2) นำตัวอย่างที่ชั่งน้ำหนักมาบด ร่วมกับการเติมในโตรเจนเหลว จากนั้นค่อย ๆ เทผงตัวอย่างที่บดได้ละเอียดแล้วลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ รอจนกระทั่งในโตรเจนเหลวระเหยออกไปหมด แต่ระวังอย่าให้ตัวอย่างละลาย แล้วทำขั้นตอนต่อไปทันที
- 3) เติม RLT buffer หรือ RLC buffer ลงไปในผงตัวอย่างที่บดไว้ 100 mg นำไป vortex ให้เข้ากันเป็นอย่างดี
- 4) บีบเปิดสารละลายตัวอย่างลงใน QIAshredder spin column (สีม่วง) นำไปวางบน collection tube 2 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที ต้องระมัดระวังการดูดสารละลายส่วนบนลงไปในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ โดยไม่ให้มีเศษเซลล์ปนอยู่ ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้สารละลายส่วนบน (supernatant) เพื่อนำไปใช้ขั้นตอนต่อไป
- 5) เติม Absolute ethanol ลงไป 0.5 เท่า (ประมาณ 225 μ l) โดยเติมลงไปใน cleared lysate และผสมให้เข้ากันทันทีโดยใช้ปิเปต จากนั้นทำในขั้นตอนต่อไปทันที
- 6) นำตัวอย่าง (ปริมาตร 650 μ l) ใส่ลงใน RNeasy mini column (สีชมพู) ที่วางอยู่บน collection tube ขนาด 2 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบมากกว่า 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ทั้งส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ลงมา
- 7) เติมสารละลาย buffer RW1 ลงไปใน RNeasy column ค่อย ๆ ปิดฝา และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบมากกว่า 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อล้างคอลัมน์ จากนั้นทั้งส่วนที่ไหลผ่านออกไป
- 8) ย้าย RNeasy column ใส่ใน collection tube ขนาด 2 ml ใหม่ หลังจากนั้นบีบเปิดสารละลาย RPE buffer ปริมาตร 500 μ l ลงไปใน RNeasy column ค่อย ๆ ปิดฝาลงอย่างระมัดระวัง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบมากกว่า 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อล้างคอลัมน์ ทั้งส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ลงมา
- 9) เติมสารละลาย RPE buffer ปริมาตร 500 μ l ลงไปใน RNeasy column ปิดฝาลงอย่างระมัดระวัง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบมากกว่า 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
สำหรับการชะอาร์เอ็นเอ ทำการย้าย RNeasy column ลงใน collection tube ใหม่ ขนาด 1.5 ml
และบีบเปิด RNeasy-free water ปริมาตร 30-50 μ l ลงไปใน RNeasy
- 10) silica-gel membrane ปิดฝาลงอย่างระมัดระวัง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบมากกว่า 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อที่จะทำการชะ
- 11) ถ้าต้องการให้มีปริมาณอาร์เอ็นเอมากกว่า 20 μ g ให้ทำซ้ำตรงขั้นตอนการชะ (ขั้นตอนที่ 10) โดยใช้ RNeasy-free water แล้วชะลงใน collection tube เดิม

II. pGEM[®] -T Easy vector Systems (Promega, USA)

pGEM[®] -T Easy vector Systems (Promega, USA) เป็นระบบที่สะดวกใช้สำหรับการโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ทำการเตรียมพาหะโดยการตัด Promega's pGEM[®] -T Easy vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* และเติม 3' terminal thymidine ที่ปลายทั้งสองด้าน single 3'-overhang ที่บริเวณสอดแทรกจะเพิ่มประสิทธิภาพในการเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากลับพลาสมิดโดยใช้ thermostable polymerase

การเชื่อมต่อโดยใช้ pGEM[®] -T Easy vector และ 2X Rapid Ligation Buffer

1. นำเอาหลอด pGEM[®] -T Easy vector และหลอด Control Insert DNA ไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วเพื่อให้สารประกอบรวมอยู่ที่กันหลอด
2. ปฏิบัติการเชื่อมต่อทำตามคำอธิบายด้านล่าง หมายเหตุ: ใช้หลอดขนาด 0.5 ml ที่มีค่า DNA-binding capacity ต่ำ
3. vortex สาร 2X Rapid Ligation Buffer อย่างรวดเร็วก่อนนำมาใช้
4. ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง หากต้องการให้มี transformant เพิ่มมากขึ้นให้นำหลอดปฏิกิริยาบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาข้ามคืน

Components	Standard Reaction	Positive Control	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM [®] -T Easy Vector (50ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR product	X µl*	-	-
Control Insert DNA	-	2 µl	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
deionized water to a final volume of	10 µl	10 µl	10 µl

*Molar ratio ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์: พาหะ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสม

III. ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit)

1. นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปแยกขนาดด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาตัดแยกเอาเฉพาะชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ใบมีดใหม่ที่ปลอดเชื้อ และแยกเจลส่วนเกินออกไป

2. ชั่งน้ำหนักเจลและนำมาเติมสารละลาย QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรของเจล (100 mg มีค่าประมาณ 100 μ l) ซึ่งเจลต้องมีน้ำหนักไม่เกิน 400 mg/คอลัมน์
3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (หรือจนกระทั่งเจลละลาย) เพื่อช่วยให้เจลละลายได้ดีขึ้น นำไป vortex ทุก ๆ 2-3 นาที ในระหว่างการบ่ม
4. หลังจากเจลละลายดีแล้ว เช็ดสีของสารละลายให้ได้สีเหลือง (ถ้าเป็นสีส้มหรือสีม่วง เติมสารละลาย Sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.0 ปริมาตร 10 μ l) จนสีของสารละลายเป็นสีเหลือง
5. เติมสารละลาย Isopropanol ปริมาตร 1 เท่า (เช่น เจลมีน้ำหนัก 100 mg เติมสารละลาย Isopropanol ปริมาตร 100 μ l) กลับหลอดเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที
6. นำ QIA quick spin column ไปวางบน collection tube ขนาด 2 ml
7. เติมสารละลายตัวอย่างลงไปใน QIA quick column ความจุสูงสุดประมาณ 800 μ l และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด (13,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 1 นาที
8. ทิ้งส่วนที่ผ่านลงไป และย้าย QIA quick column กลับมาใส่ใน collection tube เดิม
9. เติมสารละลาย QG buffer ลงไปปริมาตร 0.5 ml ลงใน QIA quick column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
10. เติมสารละลาย PE buffer ลงใน QIA quick column ปริมาตร 0.75 ml ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที
11. ทิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์ลงมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที และ ทิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์ลงไป ทำให้เมมเบรนแห้งโดยปั่นเหวี่ยงอีก 1-2 นาที
12. ย้าย QIA quick column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 ml
13. ชะดีเอ็นเอด้วยสารละลาย EB buffer ปริมาตร 50 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที (ถ้าต้องการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เติมสารละลาย elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที

IV. The Gene ImagesTM AlkPhos DirectTM labeling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech)

วิธีการเตรียมตัวตรวจตาม (probe) และการติดฉลากด้วยสารละลาย Gene Images AlkPhos DirectTM labelling kit

1. เตรียม cross-linker working solution โดยการผสม cross-linker solution ปริมาตร 2 μ l เข้ากับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 8 μ l
2. เจือจางดีเอ็นเอที่จะนำมาติดฉลากให้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 10 นาโนกรัมต่อ μ l โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อในการเจือจางดีเอ็นเอ

3. ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วมา 10 μ l ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ และนำไปทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
4. นำดีเอ็นเอมาแขวนน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (quick spin) 2-3 วินาที
5. เติม reaction buffer ปริมาตร 10 μ l ลงในสารละลายดีเอ็นเอที่แขวนในอ่างน้ำแข็ง ผสมให้เข้ากันอย่างเบามือ

Hybridization

1. เตรียม AlkPhos Direct hybridization buffer แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C ปริมาตรของ buffer ที่เหมาะสมเท่ากับ 0.25 ml/cm² ของแผ่นไนลอนเมมเบรน
2. นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอตรึงอยู่ไป prehybridize ที่อุณหภูมิ 55 °C อย่างน้อย 15 นาที ใน hybridization oven
3. เติมตัวตรวจตามที่ต้องการแล้วลงใน ข้อ 2. โดยที่ตัวตรวจตามต้องมีความเข้มข้น 5-10 ng/buffer 1 ml
4. ทำการ Hybridized ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 55 °C ใน hybridization oven

Post hybridization stringency washes

1. ทำการอุ่นสารละลาย buffer primary wash ให้มีอุณหภูมิ 65 °C ปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้เท่ากับ 2-5 ml/cm² ของแผ่นไนลอนเมมเบรน
2. ย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยความระมัดระวังและล้างด้วยสารละลาย buffer ในข้อ 1. ทำการล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที ด้วยการเขย่าเบาๆ
3. ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนอีกครั้งด้วยสารละลาย buffer primary wash ที่เหลือในข้อ 1. ที่สภาวะเดิม
4. ย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรนลงในภาชนะที่สะอาด เติมสารละลาย buffer secondary wash ลงไป จากนั้นเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
5. ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนอีกครั้งด้วยสารละลาย buffer secondary wash ที่เหลือในข้อ 4. ที่สภาวะเดิม

Signal generation and detection

1. กำจัดสารละลาย buffer secondary wash ส่วนเกินจากแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยการแตะมุมของแผ่นไนลอนเมมเบรนบนภาชนะที่สะอาด หายแผ่นไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอตรึงอยู่ขึ้นวางบนนิวสตุทท์ที่ไม่มีการดูดซับ มีความเรียบและสะอาด ระวังอย่าให้แผ่นไนลอนเมมเบรนแห้ง

2. ปิเปตสาร Detection reagent ลงบนแผ่นในลอนเมมเบรน ทิ้งไว้ 2-5 นาที
3. ประกบแผ่นในลอนเมมเบรนกับแผ่นฟิล์ม (autoradiography film; Hyperfilm™ EC)
4. ตรวจสอบแถบปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันที่เกิดขึ้น

V. วิธีการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation) และโคลนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยใช้ Rapid DNA Ligation & Transformation kit #1432

วิธีการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation) เข้ากับพลาสมิด

1. เติมพลาสมิด (ปริมาณ 50-100 ng) และชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ (ปริมาตร 5-10 µl) ที่ละลายในน้ำ หรือ TE buffer pH 7.8
2. เติมสารประกอบ ดังนี้

5x Rapid ligation buffer	4	µl
น้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส	19	µl
T4 DNA Ligase (5 u)	1	µl

ผสมให้เข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์และนำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 3-5 วินาที

3. บ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 22 °C เพื่อให้ได้ปริมาณพลาสมิดลูกผสมสูงสุดอาจจะบ่มเป็นเวลามากกว่า 1 ชั่วโมง
4. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อไว้แล้วมา 2-5 µl สำหรับการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (1 ปฏิบัติการ)

การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation) โดยใช้ TransformAid™ Bacterial Transformation System

1. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียข้ามคืน
 - 1) นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเซลล์แบคทีเรีย มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TransformAid™ C-Medium ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน
 - 2) นำหลอดที่มีอาหาร TransformAid™ C-medium (ปริมาตร 1.5 ml สำหรับการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน 2 ครั้ง) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C
 - 3) นำเซลล์จากข้อ 1 ปริมาตร 1/10 เท่า เติมลงในหลอดที่เตรียมได้จากข้อ 2 โดยเติมเซลล์เพาะเลี้ยง ปริมาตร 0.15 ml เติมลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร C-medium ปริมาตร 1.5 ml นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที

2. วิธีการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation)
 - 1) นำอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน มาบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที
 - 2) เตรียม TransformAid™ T-solution โดยปิเปต T-solution (A) และ T-solution (B) ในปริมาตรที่เท่ากัน (โดยนำสารละลายแต่ละชนิดปริมาตร 500 μ l สำหรับการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน 2 ครั้ง) จากนั้นนำ TransformAid™ T-solution มาแช่ในอ่างน้ำแข็ง
 - 3) เซลล์ที่ทำการบ่มเพาะเลี้ยงมา 20 นาที มาปิเปตลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ และนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
 - 4) เทสารละลายส่วนใสทิ้งไป และละลายตะกอนเซลล์ใน TransformAid™ T-solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มต่อในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
 - 5) นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และเทสารละลายส่วนใสทิ้ง
 - 6) ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TransformAid™ T-solution ปริมาตร 120 μ l และนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
 - 7) เตรียมดีเอ็นเอสำหรับการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (นำเอาสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ทำการเชื่อมต่อเรียบร้อยแล้วมา 1-5 μ l) ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ และนำไปบ่มต่อในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
 - 8) เติมเซลล์ที่ละลายกลับจากข้อ 6 ในหลอดที่มีดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 μ l และนำไปบ่มต่อในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
 - 9) นำไปกระจายเซลล์ลงบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน หลังจากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C

VI. Coomassie PlusTM Protein Assay Kit (PIERCE)

การเตรียมสารปฏิริยามาตรฐาน

I. การเตรียมสาร Diluted Albumin (BSA) Standards

การเตรียมสารเตรียมตามตารางที่ 14 ทำการเจือจางสาร Albumin (BSA) Standards 1 ampule ลงในหลอดที่สะอาดและใช้สารตัวเดียวกันนี้เป็นสารตัวอย่าง สาร Albumin (BSA) Standards 1 ampule ปริมาตร 1 ml จะเพียงพอต่อการเตรียมชุดสารละลายเจือจางมาตรฐานในแต่ละครั้งและเพียงพอในการทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ตามตารางที่ 14

ตารางที่ 16 การเตรียม Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube and Microplate Protocols (Working Range = 100-1,500 µg/ml)

<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u>	<u>Volume and Source of BSA</u>	<u>Final BSA Concentration</u>
A	0	300 µl of stock	2,000 µg/ml
B	125 µl	375 µl of stock	1,500 µg/ml
C	325 µl	325 µl of stock	1,000 µg/ml
D	175 µl	175 µl of vial B dilution	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl of vial C dilution	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl of vial E dilution	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl of vial F dilution	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl of vial G dilution	25 µg/ml
I	400 µl	0	0 µg/ml = Blank

II. การผสมสารและทำสมมูลสารละลาย Coomassie PlusTM Protein Assay Reagent

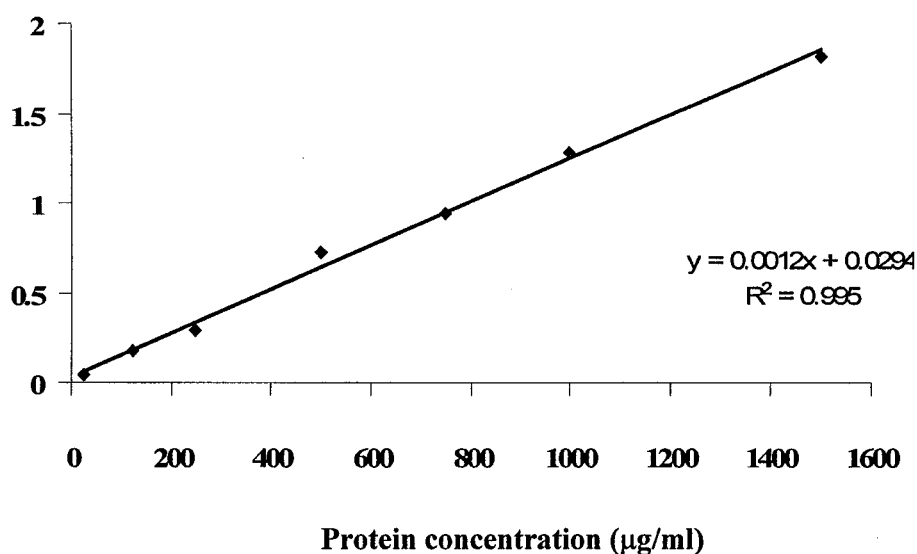
สารละลาย Coomassie PlusTM Protein Assay Reagent จะนำมาผสมทันทีก่อนใช้โดยการ
กลับขวดใส่สารหลาย ๆ ครั้ง (ห้ามเขย่าขวดสารละลาย) นำเอาสารละลายออกมาเท่าที่จำเป็นต้อง
ใช้และทำให้สมมูลที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

III. Standard Test Tube Protocol (Working Range = 100-1,500 µg/ml)

1. เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละตัว ปริมาตร 0.05 ml ลงในสารละลายตัวอย่าง ทำ
สัญญาณไว้ที่หลอดทดลอง
2. เติม Coomassie PlusTM Protein Assay Reagent ปริมาตร 1.5 ml ลงในแต่ละหลอด
และผสมให้เข้ากันดี
3. เพิ่มเติม: ถ้าต้องการได้ผลที่ถูกต้องมากที่สุดต้องทำการบ่มสารละลายตัวอย่างที่
อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
4. วัดความยาวคลื่นของสารละลายด้วยเครื่องมือ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น
595 nm set zero ด้วยน้ำเปล่าและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

5. คำนวณค่าเฉลี่ยของ blank ที่ความยาวคลื่น 595 nm และทำซ้ำอีกครั้ง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวและตัวอย่างสารละลายที่ไม่ทราบความเข้มข้นของโปรตีน และทำการวัดซ้ำในทุกๆตัวอย่างอีกครั้ง
6. สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ถูกต้องระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน BSA กับความเข้มข้นของโปรตีนในสารมาตรฐานในหน่วย $\mu\text{g/ml}$ และใช้กราฟมาตรฐานที่ได้นี้ในการตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

Absorbance (595 nm)



ภาพที่ 40 กราฟมาตรฐานของโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน

ภาคผนวก ช
เครื่องหมายมาตรฐาน

I. เครื่องหมายโปรตีน (protein marker)

1. P7707S Protein Marker

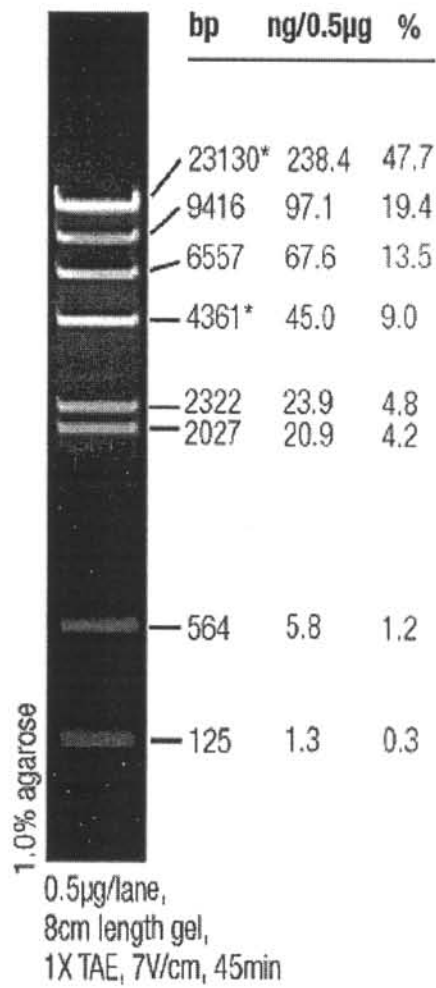
P7707S Protein Marker มีทั้งหมด 8 แถบด้วยกัน (หน่วย Da): 175000, 83000, 62000, 47500, 32500, 25000, 16500 และ 6500



II. เครื่องหมายมาตรฐานดีเอ็นเอ (standard DNA marker)

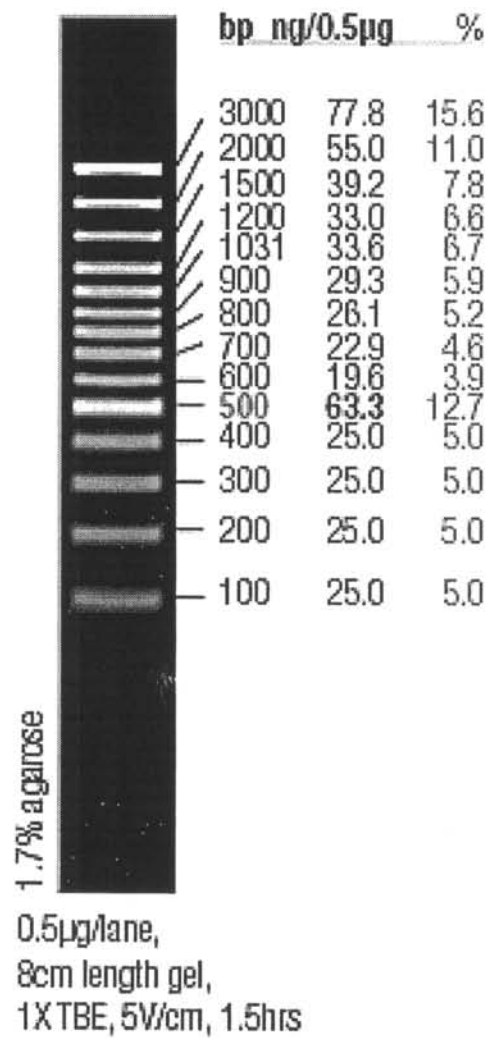
1. λ HindIII marker

λ HindIII marker มีทั้งหมด 8 ชิ้นส่วน (หน่วย bp): 23130, 9416, 4361, 2322, 2027, 564 และ 125 (fermentas)



2. 100 bp DNA Ladder

100 bp DNA Ladder มีทั้งหมด 14 ชิ้นส่วน (หน่วย bp): 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100



ภาคผนวก ฅ

ตัวย่อของอะมิโนเอซิด (amino acid abbreviation)

ตัวย่อของอะมิโนเอซิด (amino acid abbreviation)

Amino acids	Three-letter	One-letter
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Aspartic acid	Asp	D
Asparagine	Asn	N
Cysteine	Cys	C
Glycine	Gln	G
Glutamic acid	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

ภาคผนวก ญ
การเผยแพร่ผลงานวิชาการ



การเผยแพร่ผลงานวิชาการ

1. Wanitchang, A., Siriyotha, W., Thanonkeo, S., Theerakulpisut, P. & Thanonkeo, P. (2004, February 3-6). Growth and accumulation of organic and inorganic solutes in leaves and roots of rice seedling during salt stress. In: **Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology**. Proceedings of the 15th Annual Meeting of the Thai society for Biotechnology. Chiang Mai, Thailand.
2. Wanitchang, A., Theerakulpisut, P., Vichitphan, S. & Thanonkeo, P. (2005, November 2-5). Salt-stress response in rice (*Oryza sativa* L.) cultivar KDML105. In: **TSB Annual Meeting at BioThailand 2005: Biotechnology Challenges in the 21st Century**. Proceedings of the 21st TSB Annual Meeting at BioThailand 2005. Bangkok, Thailand.