

ภาคผนวก

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. เตรียม Stock solutions

1.1) เตรียม 1 M GLU โดยชั่งสาร L-GLU (Sigma[®]) = 0.9350 g. ทำให้เป็นสารละลาย 3 ml. ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 ml.

1.2) เตรียม 0.01 M KA โดยชั่งสาร KA (Sigma[®]) = 0.0106 g. ทำให้เป็นสารละลาย 3 ml. ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 ml.

1.3) เตรียม 0.01M NMDA โดยชั่งสาร NMDA (Sigma[®]) = 0.0735 g. ทำให้เป็นสารละลาย 3 ml. ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 ml.

1.4) เตรียม 1 M folic acid โดยชั่งสาร folic acid (Sigma[®]) = 4.4190g. ทำให้เป็นสารละลาย 3 ml. ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 ml.

1.5) เตรียม 0.01 M ZnSO₄ โดยชั่งสาร ZnSO₄ (Sigma[®]) = 1.6154g. ทำให้เป็นสารละลาย 3 ml. ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 ml.

2. สารละลายที่ใช้ใน *in vitro*, *in vivo*

2.1 *in vitro*

2.1.1) GLU 0.1 mM : ใช้ GLU 0.01 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.2) GLU 1 mM : ใช้ GLU 0.1 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.3) GLU 10 mM : ใช้ GLU 1 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.4) KA 0.01 mM : ใช้ KA 0.001 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.5) KA 0.1 mM : ใช้ KA 0.01 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.6) NMDA 0.01 mM : ใช้ NMDA 0.001 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.7) NMDA 0.1 mM : ใช้ NMDA 0.01 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.8) folic acid 10 mM : ใช้ folic acid 1 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.9) ZnSO_4 0.1 mM : ใช้ ZnSO_4 0.01 M ปริมาตร 50 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.1.10) H_2O_2 3 mM : ใช้ 3% H_2O_2 (Sigma[®]) ปริมาตร 17 μ l. ผสมใน choline-Kreb's solution ให้ได้ปริมาตร 5 ml.

2.2 *in vivo*

2.2.1) GLU 10 μ moles/eye : ใช้ GLU 1 M ปริมาตร 10 μ l. ฉีดเข้าสู่ดวงตา

2.2.2) folic acid 10 μ moles/eye : ใช้ folic acid 1 M ปริมาตร 10 μ l. ฉีดเข้าสู่ดวงตา

2.2.3) ZnSO_4 0.1 μ moles/eye : ใช้ ZnSO_4 0.01M ปริมาตร 10 μ l. ฉีดเข้าสู่ดวงตา

2.2.4) H_2O_2 3 μ moles/eye : ใช้ 3 % H_2O_2 ปริมาตร 3.4 μ l. ฉีดเข้าสู่ดวงตา

3. สารละลาย : sodium - Kreb's solution

ประกอบด้วย

6.4860 g. of NaCl (Carlo Erba[®])

0.1932 g. of NaHCO_3 (Merck[®])

0.1221 g. of CaCl_2 (Carlo Erba[®])

0.1491 g. of KCl (Carlo Erba[®])

0.9008 g. of glucose (Fluka[®])

ผสมสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 ml. เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย : choline - Kreb's solution

ประกอบด้วย

15.4989 g. of choline Cl (Searle[®])

0.1932 g. of NaHCO₃ (Merck[®])

0.1221 g. of CaCl₂ (Carlo Erba[®])

0.1491 g. of KCl (Carlo Erba[®])

0.9008 g. of glucose (Fluka[®])

ผสมสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 ml. เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลายที่ใช้ในการปั่นล้างจอประสาทตา

25 mM Tris buffer saline ประกอบด้วย

8 g. of NaCl (Carlo Erba[®])

0.2 g. of KCl (Carlo Erba[®])

3 g. of Trisma base (Sigma[®])

ผสมสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 800 ml. ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml. นำไปบอญึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที (autoclave)

6. สารละลายที่ใช้ในการย่อยสลายจอประสาทตา

digestion buffer solution ประกอบด้วย

1.6880 g. of NaCl (Carlo Erba[®])

0.2422 g. of Trisma base (Sigma[®]) ปรับ pH เป็น 8 ด้วย HCl

9.30×10^{-3} g. of EDTA (Merck[®])

1 g. of sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma[®])

ผสมสารทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 200 ml. นำไป autoclave

20 mg/ml proteinase-K (Sigma[®])

7. สารละลายที่ใช้ในการสกัด DNA ของจอประสาทตา

ประกอบด้วย

phenol saturated in TE buffer

chloroform : isoamyl alcohol (24:1)

absolute ethanol

70% ethanol

เตรียม phenol saturated in TE buffer : โดยชั่ง phenol 20 g. ผสมใน TE buffer ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ ให้แยกชั้น เวลาใช้ดูดชั้นล่างขึ้นมาเบาๆ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

เตรียม chloroform : isoamyl alcohol : เตรียมจาก chloroform ปริมาตร 120 ml. ผสมใน isoamyl alcohol ปริมาตร 5 ml. เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

เตรียม absolute ethanol: เตรียมจาก 100% ethanol ปริมาตร 100 ml. เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

เตรียม 70% ethanol: เตรียมจาก 100% ethanol ปริมาตร 70 ml. เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 30 ml. เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

8. สารละลายที่ใช้ในการละลาย DNA จากจอประสาทตา “TE buffer”

ประกอบด้วย

0.1210 g. of Trisma base (Sigma[®])

0.0380 g. of EDTA (Fluka[®])

ผสมสารในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 8.0 เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml.

9. สารละลายที่ใช้ในการ run electrophoresis

TBE-buffer เข้มข้น 10 เท่า ประกอบด้วย

54 g. of Trisma base (Sigma[®])

27.5 g. of Boric acid (Carlo Erba[®])

0.0120 g. of EDTA (Fluka[®])

ผสมสารในน้ำกลั่น 500 ml. นำไป autoclave เวลาใช้ทำให้เจือจางลงเป็น 1 เท่า

10. สารละลาย : loading dye

ประกอบด้วย

0.25% bromophenol blue (Sigma[®]) และ 40% (W/V) sucrose in water

ผสมสารในน้ำกลั่น 10 ml. นำไป autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส