ภาคผนวก ก

EBSS 10X (Earle's balanced salt solution)

ส่วนประกอบ	กรัม
$CaCl_2$	0.20
KCl	0.40
$MgSO_4.7H_2O$	0.20
NaCl	6.80
$NaH_2PO_4.H_2O$	0.14
D-Glucose	1.00
Phenol red	0.01

เติมน้ำปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดย autoclave ที่ 121°C 20 นาที

EBSS 1X

ส่วนประกอบ	จำนวน ml
EBSS 10X	10.0
1M Hepes buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml/10,000 U/ml)	1.0
น้ำปลอดเชื้อ	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

PBS (phosphate-buffered saline)

ส่วนประกอบ	กรัม
NaH_2PO_4 (anhydrous)	0.23
Na_2HPO_4 (anhydrous)	1.15
NaCl	9.00

เติมน้ำ 900 ml ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 ด้วย 1 M NaOH หรือ 1 M HCl ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดย autoclave ที่ 121°C 20 นาที

Heat-inactivated fetal calf serum (FCS)

นำขวด FCS (500 ml) ที่เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C มาหลอมละลาย (thaw) อย่างช้า ๆ โดยใส่ขวด FCS ใน beaker ที่เติมน้ำ ทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. หลังจากนั้น นำไปหลอมละลายต่อที่ water bath อุณหภูมิ 37°C จนละลายเป็นของเหลวหมด (เขย่าขวดอย่างนิ่มนวลทุก 15 –20 นาที หลีกเลี่ยงการเกิดฟอง) inactivate complement protein ใน FCS โดยนำไปบ่มที่ water bath อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 20 นาที aliquot ใส่ sterile culture tube (ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ) และเก็บที่ –20°C

1X RPMI media

ละลาย 10X RPMI (Gibco BRL; Cat. No. 31800-022) 1 ซองในน้ำ nanopure ประมาณ 900-950 ml ใส่ 2 g $NaHCO_3$ คนบนเครื่องกวนแม่เหล็ก ปรับ pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl จนได้ pH ประมาณ 6.8-7.2 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml กรองด้วย sterile filter unit 0.2 μm (pH ของ media จะเพิ่มขึ้นประมาณ 0.2-0.3 เมื่อผ่านการกรอง) pH ของ 1X RPMI ควรอยู่ที่ 7-7.4

Complete RPMI media สำหรับ mitogenesis assay

ส่วนประกอบ	จำนวน ml
FCS	10.0
1M Hepes buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml/10,000 U/ml)	1.0
1X RPMI	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

Complete RPMI media สำหรับ mixed lymphocyte reaction

ส่วนประกอบ	จำนวน ml
FCS	10.0
1M Hepes buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml/10,000 U/ml)	1.0
500 μM 2 ME (ภาคผนวก ข)	1
1X RPMI	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

ภาคผนวก ข

Stock solution ของ Mitogen

Lipopolysaccharide (W.S. typhosa 0901; Difco Laboratories 3124-25-6 Bacto; LPS.)

เตรียม stock solution 5 mg/ml โดยใส่ 20 ml EBSS ใน vial ที่มี LPS 100 mg เขย่าเบา ๆ จนละลายหมด แบ่งใส่หลอดปลอดเชื้อ eppendorf tube เก็บแช่แข็งที่ -20 °C

Pokeweed mitogen (Sigma L-9379)

เตรียม stock solution 5 mg/ml โดยใส่ 1 ml EBSS ใน vial ขนาด 5 mg เขย่าเบา ๆ ให้ละลาย แบ่งใส่หลอดปลอดเชื้อ eppendorf tube เก็บแช่แข็งที่ -20 °C

Concanavalin A (Pharmacia Biotech. 17-0450-01)

เตรียม stock solution 1500 μg/ml โดย ชั่ง 0.015 กรัมใส่ใน 10 ml EBSS เขย่าเบา ๆ ให้ละลาย ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน sterile filter disc 0.2 μm แบ่งใส่หลอดปลอดเชื้อ eppendorf tube เก็บแช่แข็งที่ -20 °C

ในวันที่ทดลอง mitogenesis assay เมื่อเตรียมความเข้มข้นสูงสุดของ mitogen แต่ละชนิดเรียบร้อยแล้ว ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน sterile filter disc 0.2 μm ก่อนเจือจางเพื่อเตรียมความเข้มข้นอื่นที่ต้องการ

2-Mercaptoethanol (2ME)

เตรียม stock solution 5000 μM (โดยประมาณ) 2-mercaptoethanol หรือ 2-hydroxyethylmercaptan (Sigma M 7522 ความเข้มข้น 14.3 M) โดยใช้ 18 μl ใส่ใน 50 ml EBSS เขย่าสารอย่างนุ่มนวลให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน เจือจาง stock solution ที่เตรียม 100 เท่าใน media เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ 2 ME เป็น 50 μM เช่นใส่ 1 ml 5000 μM 2 ME ใน media 100 ml

Mitomycin C

ใช้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อ ใส่ 0.4 ml EBSS ใน vial ที่บรรจุ mitomycin C 2 mg (Sigma M4287) ใช้เข็มฉีดยาเดิมดูดสารละลายขึ้นลงอย่างนิ่มนวลประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อละลาย mitomycin C ได้สารละลายสีม่วงซึ่งไวต่อแสง (ห่อ vial ด้วย aluminium foil และเก็บในที่มืดที่ 4°C เพื่อรอระหว่างใช้งาน) เนื่องจากสาระลายไม่เสถียร เก็บที่ 4°C ในที่มืดได้ไม่เกิน 2-3 วัน ดังนั้น ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง ต้องระมัดระวังการใช้งาน mitomycin C เป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) และก่อลูกวิรูป (teratogen)

ภาคผนวก ค

<u>การนับจำนวนเซลล์โดยวิธี Trypan blue exclusion</u>

1. เตรียม 0.4% trypan blue โดยชั่ง 0.4 gm trypan blue ละลายใน sterile PBS 100 ml
2. นำ cell suspension ที่ได้ปรับให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการนับใช้ 100 µl cell suspension + 100 µl 0.4% trypan blue ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. ใส่สารละลายเซลล์ที่มี trypan blue 1 หยดใน haemocytometer และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์
4. นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี และเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินแยกกัน จำเป็นต้องรีบนับเซลล์ภายใน 3-5 นาทีหลังจากใส่ trypan blue (ถ้าทิ้งเซลล์ใน trypan blue เป็นเวลานาน ทุกเซลล์จะติดสีน้ำเงินหมด)
5. คำนวณ % เซลล์ที่มีชีวิตจากสูตรดังนี้:

$$\%\ \text{เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (ติดสี+ไม่ติดสี)}} \times 100$$