ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมี

**รายการวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่างๆ**

**1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์**

**1.1 วัสดุอุปกรณ์**

- บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ

- Hot plate และ magnetic stirrer

- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 15 มล.

- กระบอกฉีดยา (syring) และเข็มฉีดยาขนาดต่าง ๆ

- Automicropipette, micropipette tips และ pipette ขนาดต่าง ๆ

- โถสำหรับย้อมสี (staining jar)

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องกรองสาร และ Millipore membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครลิตร

- เครื่องชั่งแบบละเอียด (balance)

- โถดูดความชื้น

- ตู้เย็น

- เครื่อง suction

- อ่างน้ำอุ่น (water bath)

- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

- เครื่อง vortex mixture

- ตู้เพาะเลี้ยง (incubator)

- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)

- กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

**1.2 สารเคมี**

- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

- โคลชิซิน (colchicine)

- กรดอะเซติกเข้มข้น (glacial acetic acid)

- เมทานอล (methanal)

- เอทานอล 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 95% และ 70%)

- สีย้อมจิมซ่า (Giemsa’s stain)

-โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaHPO4)

- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH2PO4)

- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

**2. การเตรียมอาหารและสารเคมี**

**การเตรียม hypotonic solution**

การเตรียมสาร Hypotonic solution 0.075 M HCl

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. KCl crystal

2. น้ำกลั่น

**วิธีเตรียม**

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์ ก่อนใช้ต้องนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

**การเตรียม colchicine**

- สูตรที่ 1 ชั่ง Colchicine 0.002 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ได้ความเข้มข้น 0.2 มก./มล.

- สูตรที่ 2 ชั่ง Colchicine 0.001 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ได้ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.

Colchicine powder เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

**การเตรียม fixaive**

สารที่ใช้เตรียม

1. Glacial acetic acid

2. Absolute methanol

**วิธีเตรียม**

ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสมกับ absolute methanol 3 ส่วน เก็บใสขวดแช่ในตู้เย็น ควรทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้

**การเตรียม Sorensen buffer**

สารที่ใช้เตรียมการเตรียม

1. Stock solution A : ใช้ KH2PO4 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.

2. Stock solution B : ใช้ NaHPO4 9.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.

**วิธีเตรียม**

ใช้ stock solution A ปริมาณ 50.8 มล. ผสมกับ stock solution B ปริมาณ 49.2 มล. จะได้ Sorensen buffer (pH 6.8) 100 มล.

**การเตรียมสีย้อม Giemsa’s**

การเตรียมสีจิมซ่า 10% (10% Giemsa’s solution)

สีจิมซ่า 10% เตรียมจาก Giemsa’s stain ใช้ชนิด stock Giemsa’s solution โดยดูดสีจิมซ่าจาก stock Giemsa’s solution มา 5 มล. ละลายใน Sorensen buffer 45 มล.

**สารละลาย 1 N NaOH**

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. NaOH crytal

2. น้ำกลั่น

**วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มล.)**

**2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล**

* 1. **วัสดุอุปกรณ์**

1. Auto-Pipette ขนาด 0.5-10 µl
2. Auto-Pipette ขนาด 2-20 µl
3. Auto-Pipette ขนาด 10-100 µl
4. Auto-Pipette ขนาด 100-1,000 µl
5. dNTP set
6. Micro Pipette Tip 0.1-10 µl
7. Micro Pipette Tip 10-200 µl
8. Micro Pipette Tip 200-1,000 µl
9. Micro Tube ขนาด 200 µ
10. Micro Tube ขนาด 1.5 ml
11. เครื่องถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต
12. เครื่องกลั่นน้ำ
13. เครื่อง gel electrophoresis
14. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
15. เครื่องทำ PCR (PCR machine:CR cobett Research)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง
17. ตู้ควบคุมความเย็นเก็บตัวอย่าง -20 C
18. ตู้เย็น
19. ตู้อบฆ่าเชื้อ
20. หม้อนึ่งความดันไอ
21. ถุงมือยาง เบอร์ M
22. หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 20 ml
23. อลูมิเนียมฟอยด์ ขนาด 24/18 นิ้ว
24. อ่างน้ำอุ่น (water bath)
    1. **สารเคมี**
25. Bromophenol blue (C19H10Br4O5S)
26. ß-mercaptoethanol (HSCH2CH2OH)
27. Chlrofrom (CHCl3)
28. Enzyme Taq DNA polymerase
29. Ethanol (CH3CH2OH)
30. Ethidium bromide (EtBr: C21H20BrN3)
31. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA: C10H16N2O8)
32. GenePure Agarose
33. Isopropanol (C3H8O)
34. Phenol (C6H5OH)
35. Primers
36. Protienase K
37. RNase A
38. Silica gel
39. Sodium chloride (NaCl)
40. Sucrose (C12H22O11)
41. TAE buffer
42. TE buffer
43. Tris base (C4H11NO3)

**การเตรียมสารต่างๆเพื่อใช้ในงานวิจัย**

1. **การเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร**

**ส่วนผสม**

1. agarose 0.6 กรัม

2. 1X TAE buffer 30 มิลลิลิตร

**วิธีเตรียม** ชั่งสาร agaroseให้ได้ปริมาณ 0.6 กรัม ใส่ในขวดทดลอง เติม1X TAE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปอุ่นในเตาอบไมโครเวฟ หรือในอ่างน้ำอุ่น เมื่อเดือดให้เอาขวดทดลองออกมา แกว่งเพื่อให้ agarose ละลายได้ดียิ่งขึ้น อุ่นจนกว่าพบว่าได้สารละลายที่ใสไม่มีผง agarose เหลือในสารละลาย ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงจนรู้สึกว่าสารละลายอุ่น ระหว่างนี้ให้แกว่งขวดทดลองเป็นระยะ เทสารละลายลงในถาดเตรียมเจล ที่จัดวางหวีเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอไว้แล้ว ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัว ก่อนนำไปใช้ให้ยกหวีออกอย่างระมัดระวัง

**2. การเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร**

**ส่วนผสม**

1. agarose 0.32 กรัม

2. 1X TAE buffer 40 มิลลิลิตร

**วิธีเตรียม** มีขั้นตอนการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซนต์

**3. 1X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร**

**ส่วนผสม**

1. Tris-base 10.8 กรัม

2. glacial acetic acid 5.5 กรัม

3. 5 M EDTA 4 มิลลิลิตร

4. น้ำกลั่น 996 มิลลิลิตร

**วิธีเตรียม** ละลาย Tris-base, glacial acetic acid และ 5 M EDTA ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อควบคุมความดัน ทิ้งให้เย็น แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**4. TE buffer ปริมาตร มิลลิลิตร**

**ส่วนผสม**

1. Tris-base 0.303 กรัม

2. EDTA 0.093 กรัม

**วิธีเตรียม** ละลาย Tris-base และ EDTA ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ pH8.4 และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อควบคุมความดัน ทิ้งให้เย็น แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**5. Loading buffer**

**ส่วนผสม**

1. sucrose 40 กรัม

2. bromophenol blue 0.25 กรัม

3. น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

**วิธีเตรียม** ละลาย sucroseและ bromophenol blue ในน้ำกลั่นจากนั้นเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส