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 ($NaHPO_4$)

- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 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 KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.

2. Stock solution B : ใช้ $NaHPO_4$ 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

1.1 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)

1.2 สารเคมี

(1) Bromophenol blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)

(2) ß-mercaptoethanol ($HSCH_2CH_2OH$)

(3) Chlrofrom ($CHCl_3$)

(4) Enzyme Taq DNA polymerase

(5) Ethanol (CH_3CH_2OH)

(6) Ethidium bromide (EtBr: $C_{21}H_{20}BrN_3$)

(7) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA: $C_{10}H_{16}N_2O_8$)

(8) GenePure Agarose

(9) Isopropanol (C_3H_8O)

(10) Phenol (C_6H_5OH)

(11) Primers

(12) Protienase K

(13) RNase A

(14) Silica gel

(15) Sodium chloride (NaCl)

(16) Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

(17) TAE buffer

(18) TE buffer

(19) Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)

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 agarose ให้ได้ปริมาณ 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 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัวก่อนนำไปใช้ให้ยกหวีออกอย่างระมัดระวัง

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 ในน้ำกลั่นจากนั้น ปรับปริมาตรเป็น 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 sucrose และ bromophenol blue ในน้ำกลั่นจากนั้นเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส