ภาคผนวก

การเตรียม buffer และสารละลายต่างๆ

1. extraction buffer

   1.1 DNA extraction buffer

   0.1 Tris pH 8.0

   0.05 M EDTA

   0.5 M NaCl

   0.01 β - Mercaptoethanol

   1.2 RNA extraction buffer

   0.2 M Tris – HCl

   0.1 M LiCl

   0.5 M EDTA

   10 % SDS

   Water

2. 0.5 M EDTA

   ชั่ง (disodium ethylenediamine tetraacetate : EDTA). $2H_2O$ 136.1 g ในน้ำ 200 ml กวนอย่างแรงๆ ด้วย magnetic stirrer เติมเกล็ด NaOH ลงไปจนกระทั่งได้ pH เป็น 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA จะละลายหมดพอดี ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ml และ autoclave

3. 1 M NaCl

   ละลาย NaCl 29.2 g ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml แล้ว sterile ด้วย autoclave

4. 1 M HCl

   สำหรับปริมาตร 1 litre เติม concentrated HCl 86.2 ml ลงในน้ำกลั่น 913.8 ml ผสมให้เข้ากัน ควรทำใน chemical hood เพราะไอกรดของ HCl จะเกิดเป็นควันฟุ้งกระจาย

5. สารละลาย Phenol อิ่มตัว

   เตรียมโดยเอา phenol มาทำให้หลอมละลายโดยแช่ใน waterbath ที่ 65°C เติม hydroxy quinoline ซึ่งเป็นสารพวก antioxidant ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 % เติม 0.1 M Tris – HCl pH 8.0 ปริมาตรเท่าตัว กวนอย่างแรงด้วย magnetic stirrer นาน 10-15 นาที 10 – 15 นาที

ปล่อยให้แยกชั้นและดูดเอา aqueous phase ชั้นบนออก สกัดซ้ำอีกครั้งด้วย 0.1M Tris – HCl 8.0 จนกระทั่ง pH ของ phenol มากกว่า 7.8 (วัดด้วย pH paper) เติม β - mercaptoethanol ให้ได้ 0.2 % และเติม 0.1 M Tris – HCl pH 8.0 ให้ท่วมผิวของสารละลายและ เก็บสารละลาย phenol อิ่มตัวที่ได้ในขวดสีเข้มที่ 4 °C

6. Phenol / Chloroform

ผสม melted phenol และ chloroform ปริมาตรเท่ากัน แล้วเติม 0.1 M Tris – HCl pH 7.6 เขย่าแรง ๆ ให้ผสมกัน ปล่อยให้แยกชั้น ดูดชั้นบนออกทิ้งไปสกัดซ้ำด้วย 0.1 M Tris – HCl pH 7.6 อีก 2 – 3 ครั้ง เติม 0.1 M Tris – HCl pH 7.6 ให้ท่วมผิว solution เก็บในขวดสีเข้มที่ 4°C

7. 1 M Tris – HCl

ละลาย Tris base 121.1 g ในน้ำ 800 ml ปรับ pH โดยการใช้กรด HCl เข้มข้นจนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการ (pH 7 - 8) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ml sterile ด้วยการ autoclave

8. 10% SDS (sodium dedocyl sulfate)

ละลาย SDS 10 g ในน้ำกลั่นที่ sterile แล้ว 100 ml อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. 3 M potassium acetate

ชั่ง potassium acetate 29.46 g ละลายในน้ำให้ได้ปริมาตร 60 ml เติม gacial acetic acid 11.5 ml และน้ำ 28.5 ml จะได้สารละลายที่มี potassium acetate ความเข้มข้น 3 M และ acetic acid ความเข้มข้น 5 M sterile โดยการ autoclave

10. 3 M Sodium acetate pH 5.2

ชั่ง Sodium acetate $3H_2O$ 408.1 g ละลายในน้ำ 750 ml เติม glacial acetic acid จนกระทั่งได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 litre และ sterile โดยการ autoclave

11. 10 x TBE

Tris – base 32.4 g

Boric acid 16.5 g

EDTA 2.79 g

Water 300 ml

ละลาย Tris – base และ boric acid บน heated sitrrer plate จากนั้นนำสารละลายมาsterile ด้วยการ autoclave

12. การ Treat สารด้วย diethylpyrocabonate (DEPC)

เติม DEPC 1 ml ลงในสารละลายที่จะทำการ treat 1000 ml เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปทำ autoclave เพื่อทำลาย DEPC ประมาณ 15 นาที ในกรณีที่สารละลายมีส่วนผสมของ Tris ไม่ควรเติม DEPC ลงในโดยตรงควรใช้วิธีเตรียมสารละลายด้วย น้ำที่ผ่านการ treat ด้วย DEPC แทน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสันติ โยธาราษฎร์
วัน เดือน ปี เกิด	16 กรกฎาคม 2519
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 ที่โรงเรียนกาวิละวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2537
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันราชภัฏเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University