ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายและสารย้อมเอนไซม์

1. Acrylamide stock 30% T, 2.7% C

Acrylamide	29.2	กรัม
Bisacrylamide	0.8	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากเตรียม

2. Marker dye สำหรับวิเคราะห์ไอโซไซม์

Glycerol	1.0	มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol Blue (w/v)	0.5	มิลลิลิตร

3. Marker dye สำหรับ SDS-PAGE

น้ำ	4.8	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.2	มิลลิลิตร
10% SDS	2.0	มิลลิลิตร
Glycerol	1.0	มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol Blue	0.5	มิลลิลิตร

4. Extraction buffer สูตร 1 (50 มิลลิลิตร)

1 M Tris-HCl pH 7.5	5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA.2Na	100	ไมโครลิตร
1 M $MgCl_2.6H_2O$	5	มิลลิลิตร
PVP-40	2	กรัม
2-mercaptoethanol	50	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. Extraction buffer สูตร 2 (20 มิลลิลิตร)

1 M Tris- HCl Buffer pH 8.5	1	มิลลิลิตร
sucrose	1	กรัม
2-mercaptoethanol	19	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.5

6. Running buffer สำหรับ SDS-PAGE (1 ลิตร)

Tris	3.0	กรัม
Glycine	14	กรัม
10% SDS	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 8.3

7. Running buffer สำหรับการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของเอนไซม์ (1 ลิตร)

Tris	3.028	กรัม
Glycine	14.41	กรัม

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 8.3

8. สารละลายสำหรับย้อมโปรตีนโดยวิธี Coomassie Brilliant Blue R-250

Staining solution (150 มิลลิลิตร)

Coomassie brilliant blue R-250	0.375	กรัม
Methanol	75	มิลลิลิตร
Acetic acid	15	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 150 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรองก่อนใช้ และสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Destaining solution (150 มิลลิลิตร)

Methanol	15	มิลลิลิตร
Acetic acid	7.5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 150 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

9. Coomassie brilliant blue solution สำหรับ Bradford Method (1 ลิตร)

Coomassie brilliant blue G-250	100	มิลลิกรัม
95% ethanol	50	มิลลิลิตร
85% phosphoric acid	100	มิลลิลิตร

เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

10. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Peroxidase (POX)

Stock A	3-amino-9-ethylcarbazole	0.42	กรัม
	β - naphtol	0.29	กรัม
	Acetone	200	มิลลิลิตร

(กรองในที่มืดและเก็บในที่เย็น)

Stock B 0.1 M Tris buffer pH 4 (เก็บในที่มืดและเย็น)

Stock C 3% H_2O_2 (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ผสมในอัตราส่วน A : B : C 20 : 80 : 1

11. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Glutamic-oxaloacetate transaminase (GOT)

0.1 M Tris-HCl pH 8.0	25	มิลลิลิตร
α - ketoglutaric acid	25	มิลลิกรัม
Aspartic acid	50	มิลลิกรัม

ผสมแล้วปรับ pH ประมาณ 7.4-7.5

Pyridoxal 5-phosphate (10% in water)	10	มิลลิลิตร
Fast Blue BB	50	มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Esterase (EST)

0.1 M Tris-HCl pH 7	5	มิลลิลิตร
O-Dianisidine	20	มิลลิกรัม
α - β -naphtylacetate Stock	100	ไมโครลิตร

(α - β -naphtylacetate Stock คือ α -naphtylacetate 0.05 กรัมและ β -naphtylacetate 0.1 กรัม ละลายใน acetone 1 มิลลิลิตร)

13. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Shikimate dehydrogenase (SKD)

0.1 M Tris-HCl pH 8	25	มิลลิลิตร
Shikimic acid	10	มิลลิกรัม
$NADP^+$ (10% in water)	50	ไมโครลิตร
NBT (10% in water or methanol)	50	ไมโครลิตร
PMS (10% in water)	10	ไมโครลิตร

14. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Aldehyde oxidase (ALO)

0.1 M Tris-HCl pH 7.5	25	มิลลิลิตร
NBT (10% in wate or methanol)	50	ไมโครลิตร
PMS (10% in water)	10	ไมโครลิตร
Acetaldehyde	200	ไมโครลิตร (ผสมก่อนย้อมเจล)

15. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Diaphorase (DIA)

0.1 M Tris-HCl pH 8	25	มิลลิลิตร
NADH	10	มิลลิกรัม
DCIP (1% in water)	1	ไมโครลิตร
MTT (10% in water)	10	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Glucose dehydrogenase (GLD)

0.1 M Tris-HCl pH 7.5	25	มิลลิลิตร
α -D glucose	4	กรัม
NAD^+ (10% in water)	100	ไมโครลิตร
NBT (10% in water or methanol)	50	ไมโครลิตร
PMS (10% in water)	10	ไมโครลิตร

17. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Glutamate dehydrogenase (GDH)

0.2 M Na phosphate pH 7	25	มิลลิลิตร
L-glutamic acid	0.5	กรัม
1 M $CaCl_2$	50	ไมโครลิตร
NAD^+ (10% in water)	100	ไมโครลิตร
NBT (10% in water or methanol)	50	ไมโครลิตร
PMS (10% in water)	10	ไมโครลิตร

18. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Malate dehydrogenase (MDH)

0.1 M Tris-HCl pH 7.5	25	มิลลิลิตร
L-malic acid	50	มิลลิกรัม
NAD^+ (10% in water)	100	ไมโครลิตร
NBT (10% in water or methanol)	50	ไมโครลิตร
PMS (10% in water)	10	ไมโครลิตร

19. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase (IDH)

0.1 M Tris-HCl pH 7.5	25	มิลลิลิตร
1 M $MgCl_2$	0.5	มิลลิลิตร
Isocitric acid	25	มิลลิกรัม
$NADP^+$ (10% in water)	50	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NBT (10% in water or methanol)	50	ไมโครลิตร
PMS (10% in water)	10	ไมโครลิตร

20. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Malic enzyme (ME)

0.1 M Tris-HCl pH 7.5	25	มิลลิลิตร
1 M $MgCl_2$	0.5	มิลลิลิตร
L-malic acid	100	มิลลิกรัม
ผสมแล้วปรับ pH ประมาณ 7.5		
$NADP^+$ (10% in water)	50	ไมโครลิตร
NBT (10% in water or methanol)	50	ไมโครลิตร
PMS (10% in water)	10	ไมโครลิตร

21. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD)

50 mM Na acetate pH 7.5	25	มิลลิลิตร
NBT (10% in water or methanol)	50	ไมโครลิตร
บ่มในที่มืด 30 นาที จากนั้นแทนที่ด้วย		
50 mM Na acetate pH 7.5	25	มิลลิลิตร
TEMED	0.1	มิลลิลิตร
Riboflavin	1	มิลลิกรัม

22. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Acid phosphatase (ACP)

0.1 M Na acetate pH 5	25	มิลลิลิตร
1 M $MgCl_2$	0.2	มิลลิลิตร
Naphtol-AS BI phosphate in 40% ethanol	20	มิลลิกรัม
O-dianisidine	50	มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

23. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Alkaline phosphate (ALP)

0.1 M Tris-HCl pH 8.5	25	มิลลิลิตร
1 M $MgCl_2$	0.2	มิลลิลิตร
Naphtol-AS BI phosphate in 40% ethanol	20	มิลลิกรัม
O-dianisidine	50	มิลลิกรัม

24. น้ำยาย้อมเอนไซม์ Leucine aminopeptidase (LAP)

0.1 M Na phosphate pH 6	25	มิลลิลิตร
1 M $MgCl_2$	0.5	มิลลิลิตร
L-leucine β-naphthyl acid (10% in water)	100	ไมโครลิตร
O-dianisidine	20	มิลลิกรัม

25. ส่วนผสมสำหรับ separating gel (lower gel)

น้ำ	3.35	มิลลิลิตร
1.5 M Tris –HCl pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
Acrylamide (30%T)	4.0	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (APS)	50	ไมโครลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้)
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

26. ส่วนผสมสำหรับ stacking gel (upper gel)

น้ำ	6.1	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.5	มิลลิลิตร
Acrylamide (30%T)	1.3	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% APS	50	ไมโครลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้)
TEMED	10	ไมโครลิตร

27. ส่วนผสมสำหรับ separating gel (lower gel), 11% T

น้ำ	4.65	มิลลิลิตร
3 M Tris –HCl pH 8.8	1.25	มิลลิลิตร
Acrylamide (30%T)	4.0	มิลลิลิตร
1.5% APS	0.5	มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้)
TEMED	15	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

28. ส่วนผสมสำหรับ stacking gel (upper gel), 4.5% T

น้ำ	2.7	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25	มิลลิลิตร
Acrylamide (30%T)	0.75	มิลลิลิตร
1.5% APS	0.3	มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้)
TEMED	10	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวสุพัตรา ปทุมเมือง

วัน เดือน ปีเกิด 12 พฤษภาคม 2521

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2532 สำเร็จการศึกษาชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนดาราวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2538 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนดาราวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2542 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

99/10 หมู่ 5 ตำบลท่าศาลา อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved