ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

การเตรียม Coating Buffer (pH 9.6)

Na_2CO_3	1.59 g
$NaHCO_3$	2.93 g

ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 9.6 ด้วย 1 N NaOH หรือ 20% HCl เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 10X (pH 7.4)

NaCl	80 g
KCl	2 g
$Na_2HPO_4 . 2H_2 O$	14.4 g
KH_2PO_4	2.4 g

ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 7.4 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 20% HCl เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X

PBS 10X	100 ml
ddH_2O	900 ml

การเตรียมสารละลายสำหรับการล้าง (Washing Buffer)

PBS 10X	400 ml
Tween 20	2 ml

เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 4000 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารละลาย 2% gelatin

Gelatin 2 g

Coating Buffer 100 ml อุ่นผสมให้เข้ากันที่ 37 °C เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารละลายตั้งต้น (Citrate phosphate buffer) (pH 5.0)

Citric acid (monohydrate) 10.30 g

$Na_2HPO_4.12H_2O$ 18.16 g

ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 5.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 20% HCl เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารละลายตั้งต้นสำหรับพัฒนาสีของ ELISA

O-phynylene-diamine-HCl, OPD 0.018 g

Citrate phosphate buffer 12 ml

ผสมในหลอดทดลองขนาด 15 ml ที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อกันแสง เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer เมื่อ OPD ละลายแล้วเติม 0.03 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 20 µl (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้)

การเตรียมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (Stopping solution)

เท H_2SO_4 (98 %) 21.36 ml ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร ให้เป็น 200 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารละลาย Binding Buffer (pH 7.0)

$Na_2HPO_4.12H_2O$ 3.6 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 7.0 ด้วย 1 *N* NaOH หรือ 20% HCl เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารละลาย Elution Buffer (pH 2.7)

Glycine 0.75 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 2.7 ด้วย 20% HCl เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารละลาย Neutralization Buffer (pH 9.0)

Tris 157.6 g ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 9.0 ด้วย 20% HCl เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

สารละลายสำหรับ thiophilic resin chromatography

สารละลาย ก.

Tris-HCL 12 g

K_2SO_4 87 g

ละลายในน้ำกลั่น 900 ml. ปรับ pH เป็น 7.6 ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml.

สารละลาย ข

Tris-HCL 12 g

ละลายในน้ำกลั่น 900 ml. ปรับ pH เป็น 7.6 ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml.

50X Tris-acetate buffer (TAE)

Tris base	242.0 g
Glacial acetic acid	57.1 ml
0.5 M EDTA	100.0 ml

1X TAE

50X TAE	20.0 ml
น้ำกลั่น	980.0 ml

Gel-loading buffer 6X

0.25 % Bromophenol blue

0.25 % Xylene xyanol

40 % (W/V) sucrose in H_2O

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ethidium bromide (10 mg/100 ml.)

Ethidium bromide	10.0 mg
ละลายในน้ำกลั่น	100.0 ml

40% acrylamide : bis (19:1)

acrylamide	380.0 g
bis acrylamide	20.0 g

เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

1X solution

10X PCR buffer	10 µl
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	90 µl

สารละลาย 1mM dNTPs

100 mM dATP	5.0 µl
100 mM dGTP	5.0 µl
100 mM dCTP	5.0 µl
100 mM dTTP	5.0 µl
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	480.0 µl

25 bp step ladder

stock 25 bp	5.0 µl
6X loading buffer	10.0 µl
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	45.0 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Acetic acid solution (10 %)

Glacial acetic	250.00 ml
dd H_2O added to	2500.00 ml

Acrylamide (49:1) (40 %)

Acrylamide	156.80 g
Bis-acrylamide	3.20 g
dd H_2O added to	400.00 ml

AgNO3 solution (0.1%)

AgNO3	2.50 g
dd H_2O added to	2500.00 ml

NaCl (6M)

NaCl (MW 58.44)	350.64 g
dd H_2O added to	1000.00 ml

NaOH (5N)

NaOH	200.00 g
dd H_2O added to	1000.00 ml

Nitric acid solution (1%)

65% Nitric acid	35.50 ml
dd H_2O added to	2500.00 ml

Polyacrylamide gel (6 %)

Urea	1.50 g
40 %PAA (19:1)	0.75 ml
10X TBE buffer	0.50 ml
10 % APS	50.00 µl
TEMED	5.00 µl
dd H_2O added to	5.00 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TAE (50X) buffer pH 8.0

Tris-base (MW. 121)	242.00 g
Acetic acid	57.10 ml
EDTA (0.5M) pH 8.0	100.00 ml
dd H_2O added to	1000.00 ml

TBE (10X) buffer pH 8.0

Tris-base (MW. 121)	270.00 g
Boric acid	137.50 g
0.5 M EDTA pH 8.0	2.00 ml
dd H_2O added to	1000.00 ml

TE Buffer (1X)

1M Tris pH 8.0	10.00 ml
0.5 M EDTA	2.00 ml
dd H_2O added to	1000.00 ml

Tris (pH 8.0) (1X)

Tris-base	121.00 g
dd H_2O added to	1000.00 ml

X-gal (working solution)

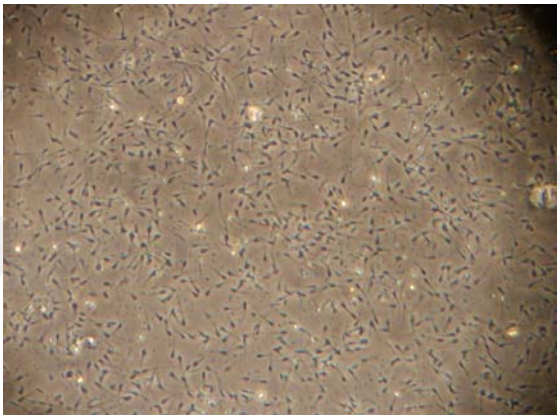
X-gal (100 mg/ml)	1.00 ml
N',N dimethylformamide	1.00 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ใช้โคเพศเมียที่เป็นสัดมาเป็นตัวล่อเพื่อให้พ่อโคขึ้น แล้วทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ

เมื่อได้ตัวอย่างน้ำเชื้อสดแล้ว นำมาส่องดูการเคลื่อนไหวหมู่ แล้วจึงนำมาเจือจางในน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:200 เพื่อนับอัตราการรอดชีวิต



ทำการเจือจางน้ำเชื้อในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ โดยคำนวณให้มีสเปิร์ม 120 x 10^6 cell/ml เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงและค่อยๆลดอุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่อย ๆ ลดอุณหภูมิสารละลายที่มีน้ำเชื้อ ให้เหลือ 5 ^{O}C (ในตู้เย็น) บ่มนาน 4 ชั่วโมง

จากนั้นนำสารละลายที่มีน้ำเชื้อ มาทำการบรรจุลงหลอดเก็บน้ำเชื้อ ปริมาตรหลอดละ 250 µl ขั้นตอนนี้ทำในตู้ที่ทำความเย็นตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 2 ^{O}C

บรรจุหลอดเสร็จแล้วนำปลายหลอดอีกด้านอุดด้วยผงอุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รีบนำหลอดน้ำเชื้อที่ได้มาวางเรียงบนถาดเหล็กแล้ว บ่มไว้ที่ 5 ^{O}C ประมาณ 1 ชั่วโมง

จากนั้นนำมาอังไว้บนไอของไนโตรเจนที่ เติมเตรียมไว้ในกล่องโฟมที่ดัดแปลงไว้สำหรับลดอุณหภูมิของหลอดน้ำเชื้อ

เมื่ออังไว้บนไอไนโตรเจนเหลวได้อุณหภูมิที่ประมาณ – 80 ^{O}C แล้วทำการเก็บหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ลงถังไนโตรเจนได้ โดยอุณหภูมิอยู่ที่ประมาณ -196 ^{O}C จะได้น้ำเชื้อโคบรรจุหลอดแช่แข็งเก็บไว้ใช้ได้นานสิบปี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวทฤษฎี คำหล่อ

วัน เดือน ปี เกิด 6 มีนาคม 2527

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับอนุบาลถึงระดับมัธยมต้น
โรงเรียนอรุโณทัยลำปาง ปีการศึกษา 2541

สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลาย
โรงเรียนลำปางกัลยาณี ปีการศึกษา 2544

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)
สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2548

ทุนการศึกษา ได้รับทุนอุดหนุนบัณฑิตศึกษา โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2550 - 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved