ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) pH 7.4

สารละลาย ก. $NaH_2PO_4.2H_2O$	78.004	กรัม/น้ำ 1 ลิตร
สารละลาย ข. $Na_2HPO_4 .12H_2O$	35.814	กรัม/น้ำ 1 ลิตร
สารละลาย ค. NaCl	61.365	กรัม/น้ำ 1 ลิตร
Gelatin	1	กรัม
น้ำอุ่น	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น 18 MΩ	1	ลิตร

นำสารละลาย ก. 6.66 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข. 66.87 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ค. 133.30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Gelatin 1 กรัมด้วยน้ำอุ่นประมาณ 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.4 ด้วย NaoOH 1 *N.* แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) pH 7.4

Iscove's Modified Dulbecco's Medium	17.7	กรัม
$NaHCO_3$	3.024	กรัม
น้ำกลั่น 18 MΩ	1	ลิตร

ผสม Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 17.7 กรัม, $NaHCO_3$ 3.024 กรัม ละลาย ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.4 ด้วย NaoOH 1 *N.* หรือ HCl 1 *N.* และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่าน filter membrane ขนาดรูที่ของเหลวกรองผ่าน 0.2 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางกระดาษกรอง 47 มิลลิเมตร ที่ประกอบเข้ากับ Side-arm flask ขนาด 1 ลิตร ต่อเข้ากับเครื่อง Vaccuum ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ

3. การเตรียม 2-Mercaptoethanol (2-ME)

เตรียมสารละลาย 2-ME (1000X) 0.035 มิลลิลิตร เติม IMDM ให้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เวลาใช้นำสารละลาย 2-ME 1 มิลลิลิตร เติมใน IMDM 1 ลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียม 10% Fetal Bovine Serum (10%FBS)

นำ Fetal Bovine Serum แช่ลงในอ่างน้ำร้อน (water bath) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ต่อไป

10 % FBS ใน IMDM ประกอบด้วย FBS 10 มิลลิลิตร เติม IMDM 90 มิลลิลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งานอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมสารละลาย Hypoxanthine, Aminopterine และ Thymidine (HAT) ความเข้มข้น 100 เท่า

โดยใช้ HAT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงใน 10 % FBS ใน IMDM 99 มิลลิลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้อุ่นใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมสารละลาย Hypoxanthine และ Thymidine (HT) ความเข้มข้น 100 เท่า

โดยใช้ HT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงใน 10 % FBS ใน IMDM 99 มิลลิลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้อุ่นใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์ (Fusion solution)

สารละลาย 50 % polyethylene glycol (PEG) ประกอบด้วย polyethylene glycol (Sigma, P3640) มวลโมเลกุล 3350 ปริมาณ 2 กรัม เติม IMDM 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (Autoclave)

สารละลาย 7.5%dimethyl sulfoxide ประกอบด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Art.802912) 7.5 มิลลิลิตร เติม IMDM ให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

Fusion solution ประกอบด้วย อัตราส่วน 50 % PEG : 7.5 % DMSO = 1 : 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบเพลท (coating buffer)

Na_2CO_3	4.29	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่ง Na_2CO_3 4.29 กรัม, $NaHCO_3$ 2.93 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 9.6 ด้วย NaoOH 1 *N.* หรือ HCl 1 *N.* แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการล้างเพลท (washing buffer)

สารละลาย PBS 10X ประกอบด้วย NaCl 80 กรัม, KCl 2 กรัม, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 14.4 กรัม, KH_2PO_4 2.4 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

Washing buffer ประกอบด้วย PBS 10X 400 มิลลิลิตร เติม polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 4,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. การเตรียมสารละลาย 2%Gelatin

ละลาย Gelatin 2 กรัม ใน Coating buffer 80 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ อุ่นใน waterbath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

11. การเตรียมสารละลายตั้งต้น (Citrate phosphate buffer)

ชั่ง citric acid (monohydrate) 10.30 กรัม, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 18.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.0 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. การเตรียมสารตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ ELISA

ชั่ง O-phenylenediamine acetate (OPD) 0.018 กรัม ละลายใน citrate phosphate buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ทำในหลอดทดลองที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อกันแสง นำไปเขย่าโดยใช้ vortex mixer เมื่อ OPD ละลายหมดแล้วจึงเติม 0.03% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 20 ไมโครลิตร (การเตรียม OPD จะต้องเตรียมก่อนใช้เท่านั้น เนื่องจากสารละลายจะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงสว่าง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. การเตรียมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (Stop solution)

การเตรียม 4*N* H_2SO_4 ประกอบด้วยสาร H_2SO_4 21.36 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

14. การเตรียม freezing media

25%FBS ใน IMDM ประกอบด้วย FBS 25 มิลลิลิตร เติม IMDM 75 มิลลิลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

Freezing media ประกอบด้วย DMSO 10 มิลลิลิตร เติม 25%FBS ใน IMDM 90 มิลลิลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15. การเตรียม dialyzing tube

ตัด dialyzing tube ความยาวตามต้องการที่จะใช้งาน (1 มิลลิลิตร = 1 เซนติเมตร) แช่น้ำกลั่นนานประมาณ 10 นาที และนำไปต้มในสารละลาย EDTA 10 mM ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มใน $NaHCO_3$ 10 mM ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วต้มในน้ำกลั่น นาน 20 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 10 นาที และเก็บไว้ในเอธานอล (ethanol) ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

16. การเตรียม saturated ammonium sulfate

ชั่ง ammonium sulfate ประมาณ 90 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (18 MΩ) 100 มิลลิลิตร ปั่นจนสารอิ่มตัว (saturated) ข้ามคืน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

17. การเตรียม 0.4% BSA

ชั่ง BSA 0.4 กรัม ละลายใน coating buffer 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งานอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

18. การเตรียม Tris-buffered saline (TBS) pH 7.5

Trizma base	3.03	กรัม
Sodium Chloride	5.84	กรัม
Magnesium chloride hexahydrate	0.20	กรัม

ผสม Trizma base 3.03 กรัม, Sodium Chloride 5.84 กรัม และ Magnesium chloride hexahydrate 0.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.5 ด้วย HCl 1 *N.* และปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

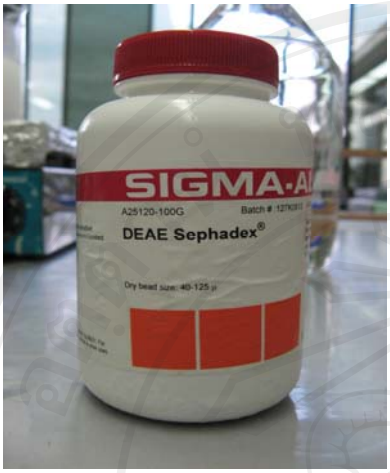
19. การเตรียม PVP และ Sephadex

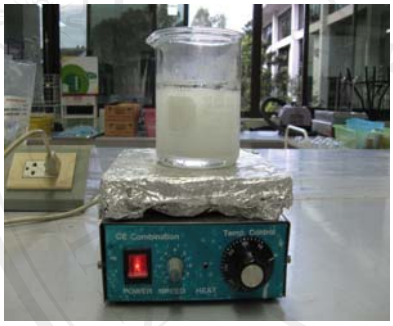
1. PVP (Polyvinylpyrrolidone ; Sigma chemical Co. Deisenhofen, germany)

1) ชั่ง PVP 50 กรัม และเติมน้ำกลั่น 500 มล.
2) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง
3) จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 100 มล.
4) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง
5) จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 100 มล.
6) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง
7) เติมน้ำกลั่นอีกครั้งให้ได้ปริมาตร 400 มล.ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระดาษอะลูมิเนียมและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Sephadex (DEAE Sephadex–A25 ; Sigma chemical Co.)





1) ชั่ง DEAE Sephadex 25 กรัม
2) เติม 0.1 M ammonium acetate, pH 8.5 ปริมาณ 300 ml และต้มภายในบีกเกอร์ที่มีน้ำร้อนภายในนาน 2 ชั่วโมง
3) ทำให้เย็นนาน 2 ชั่วโมง
4) กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยผ่านกรวยกรองและเครื่องสูบ-อากาศ
5) ตัก DEAE-Sephadex ที่เหลือบนกระดาษกรองในข้อ 4 แล้วเติม 0.1 M ammonium acetate, pH 8.5 ปริมาณ 200 มล. ผสมให้เข้ากันและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวปริญญาภรณ์ วิโรจน์สกุล

วัน เดือน ปี เกิด 24 พฤษภาคม 2526

ประวัติการศึกษา

ปี 2548	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต พืชศาสตร์ (พืชไร่) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จ.แพร่
ปี 2544	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอรุโณทัย อ.เมือง จ.ลำปาง
ปี 2541	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนอรุโณทัย อ.เมือง จ.ลำปาง

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 117/2 หมู่ที่ 3 ต.สบปราบ อ.สบปราบ จ.ลำปาง 52170

โทรศัพท์ 086-1937048

อีเมล์ parin__phon@hotmail.com

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved