ภาคผนวก ค
สารละลายสำหรับการโคลนนิ่ง และวิธีการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลดีเอ็นเอ

สารเคมี

1. TES buffer

เตรียมโดยละลาย tris 1.211 กรัม EDTA 9.306 กรัม และ NaCl 4.38 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionize water) ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 0.01 M HCl ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. TE buffer

เตรียมโดยละลาย tris 1.211 กรัม และ EDTA 9.306 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionize water) ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 0.01 M HCl ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. 1 M Tris-HCl buffer pH 8.0

เตรียมโดยละลาย tris 121.1 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionize water) ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 M HCl ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5

เตรียมโดยละลาย tris 6.056 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionize water) ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.5 ด้วย 50 mM HCl ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Sodium lauryl sulfate-proteinase K (ที่ประกอบไปด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ Sodium lauryl sulfate กับ proteinase K ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ TE บัฟเฟอร์)
(เตรียม x-gal โดยละลายในไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide) ให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

5. Sodium lauryl sufate-protienase K

เตรียมโดยละลาย sodium lauryl sufate 10 กรัม และ proteinase K 5 มิลลิกรัม ในสารละลาย TE buffer ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6. Saturated phenol solution

เตรียมฟีนอลโดยทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตรเท่าตัว เขย่าแรงๆ นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดส่วนใสทิ้ง และสกัดด้วยทริส-ไฮโดรคลอริก พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ อีก 2 ครั้ง เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. DNA buffer

เตรียมโดยผสมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$ $6H_2O$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. STET buffer

ละลายซูโครส 80 กรัม อีดีทีเอ 18.61 กรัม ไตรตันเอ็กซ์ร้อย 50 มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 8.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG)

เตรียม stock โดยละลาย Isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) 2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จนละลายเข้ากันดี ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

10. 5 Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal)

เตรียมโดยละลาย 5 Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) 20 มิลลิกรัม ในสารละลาย Dimethylformamide ให้มีปริมาตร1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอดห่อ ฟลอยด์ (Foil) ที่ –20 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องกรอง สารละลายที่ได้ควรเป็นสารละลายใสไม่มีสี ถ้ามีสีออกเหลืองไม่ควรใช้

11. 10X electrode buffer

ละลาย tris 48.44 กรัม sodium acetate 16.41 กรัม และ EDTA 7.44 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ พีเอช 8.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. Loading dye

ละลาย Bromophenol blue 0.25 กรัม และ Ficoll 15 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionize water) ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

13. การหาขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

13.1 การเตรียมอะกาโรสเจล

เตรียมอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดประมาณ 2-3 นาที เติมอิเลคโตรฟอรีซีสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า (10X) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงถาด

เจล และวางหวี (comb) ขนาด 8 หลุม ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว (ประมาณ 20 นาที) วางเจลในอิเลคโตรฟอรีซีสแชมเบอร์ (electrophoresis chamber) โดยหันด้านที่มีหลุมไปทางขั้วลบ และดึงหวีออก

13.2 การเตรียมรันนิ่งบัฟเฟอร์

นำอิเลคโตรฟอรีซีสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 เท่า (10X) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 360 มิลลิลิตร เทลงในในอิเลคโตรฟอรีซีสแชมเบอร์ ให้ท่วมแผ่นเจล

13.3 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 1-5 ไมโครลิตร เติม loading dye ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเติมดีเอ็นเอบัฟเฟอร์ให้ครบ 15 ไมโครลิตร และเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน โดยใช้ λ-DNA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และนำมาเติม loading dye เช่นเดียวกับตัวอย่างดีเอ็นเอ

13.4 การทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรฟอรีซีส

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมกับ loading dye ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมเจล แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ ประมาณ 1 ชั่วโมง ดูระยะการคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจาก loading dye จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผสมกับอิเลคโตรฟอริซีลบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 15 นาที และนำเจลมาล้างสีส่วนเกินโดยอิเลคโตรฟอริซีลบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเจลมาส่องดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร บนทรานซิลลูมิเนเตอร์ (transilluminator)