การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายและบัฟเฟอร์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertaini) **ปริมาตร** 500 **มิลลิลิตร**

Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	5	กรัม
Sodium chloride	2.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ LB with supplement ก่อนใช้นำอาหาร LB ที่ฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วมาเติม 1 M magnesium sulfate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 20% (w/v) ปริมาตร maltose ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ 2x YTA **ปริมาตร** 500 **มิลลิลิตร**

Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	8	กรัม
Sodium chloride	2.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ NZY **ปริมาตร** 500 **มิลลิลิตร**

Sodium chloride	2.5	กรัม
Magnesium sulfate hepta-hydrous	1.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
NZ amine (casein hydrolysate)	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

Ampicillin **ความเข้มข้น** 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง Ampicillin sodium salt 100 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง Kanamycin 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Tetracyclin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง Tetracyclin 10 มิลลิกรัม ละลายใน 50%(v/v) เอทานอลที่ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม 1 M $MgSO_4$ ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Magnesium sulfate 246.48 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Calcium chloride 14.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 20% Maltose

ชั่ง Moltose 20 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม 1 M Tris-HCl

ชั่ง Tris-base 121.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย Hydrochloric acid จนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียมสารละลาย SM buffer ปริมาตร 1 ลิตร

Sodium chloride	5.8	กรัม
Magnesium sulfate hepta-hydrous	2.0	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	50	มิลลิลิตร
2% (w/v) Gelatin	5.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. การเตรียม 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง sodium acetate 408.1 กรัม ละลายน้ำและปรับ pH เป็น 5.2 โดยใช้ Glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7. การเตรียมสารละลาย PBS, pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง sodium chloride 8.0 กรัม, potassium chloride 0.2 กรัม, sodium hydrogen phosphate 1.44 กรัม และ potassium dihydrogen phosphate 0.24 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วยสารละลาย sodium hydroxide ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

8.1 การเตรียม 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 18.17 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย Hydrochloric acid ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2 การเตรียม 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 12.10 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย Hydrochloric acid ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.3 การเตรียม 30% Acrylamide-bisacrylamide ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Acrylamide 29 กรัม และ N,N′-methylene-bis-acrylamide 1 กรัม ละลาย Bisacrylamide ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เติม Acrylamide จนละลายหมด ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.4 การเตรียม 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.5 การเตรียม 10% Ammonium persulphate (APS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่ง APS 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (10% APS เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

8.6 การเตรียม Tris-glycine buffer ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง SDS 1 กรัม, Glycine 14.42 กรัม และ Tris-base 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8.7 การเตรียมสารละลาย Staining ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Coomassie blue R-250 2 กรัม ละลายใน 95% Methanol 525 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรเก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.8 การเตรียมสารละลาย Destaining I ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 95% Methanol 526 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรเก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.9 การเตรียมสารละลาย Destaining II ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 95% Methanol 5.26 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรเก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.10 การเตรียม 2x sample buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

10% SDS	4	มิลลิลิตร
100% glycerol	2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.2	มิลลิลิตร
1 M DTT	2	มิลลิลิตร
Bromophenol Blue	0.002	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. การเตรียมสารละลาย 1 M IPTG

ชั่ง IPTG 2.38 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10. การเตรียมสารละลายสำหรับสกัดพลาสมิด

10.1 สารละลาย I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris 0.15 กรัม ละลายน้ำ 30 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8 ด้วย Hydrochloric acid เติม glucose 0.45 กรัม และ EDTA 0.19 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10.2 สารละลาย II ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

ผสม 10% SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับ 1 N NaOH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

10.3 สารละลาย III ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่ง Potassium acetate 14.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เติม Glacial acetic acid 5.9 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิห้อง