ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10 กรัม
Tryptone	10 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม

2. $MgSO_4$ (1M stock solution)

ละลาย $MgSO_4 .7H_2O$ จำนวน 24.65 g ในน้ำปริมาตร 100 ml กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

3. 20% Maltose stock sulution

ละลาย maltose จำนวน 20 g ในน้ำจำนวน 80 ml จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เก็บที่ 4°C

4. LB/$MgSO_4$ agar plates

นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร เติม 1 M $MgSO_4$ จำนวน 10 ml และ agar จำนวน 15 g นำมาฆ่าเชื้อด้วย Autoclave จากนั้น นำมา pour plate แล้วเก็บที่ 4°C

5. LB/ $MgSO_4$ broth

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร เติม 1M $MgSO_4$ จำนวน 10 ml นำมาฆ่าเชื้อด้วย Autoclave

6. LB/ $MgSO_4$ /maltose broth

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร เติม 1M $MgSO_4$ จำนวน10ml นำมาฆ่าเชื้อด้วย Autoclave หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50°C แล้วเติม maltose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2%

7. LB/ $MgSO_4$ soft top agar

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร เติม 1M $MgSO_4$ จำนวน10 ml และ agar จำนวน 7.2 g นำมาฆ่าเชื้อด้วย Autoclave แล้วเก็บที่ 4°C

8. 10X Lambda dilution buffer

NaCl	58.3 g
$MgSO_4 .7H_2O$	24.65 g
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	350 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำจำนวน 1 ลิตร

9. 1 X Lambda dilution buffer

10X Lambda dilution buffer	100 ml
2% gelatin	5 ml

10. LB /tet agar plates

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร เติม agar จำนวน 15 g นำมาฆ่าเชื้อด้วย Autoclave หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 50°C แล้วเติม tetracyclineให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 µg/ml จากนั้น นำมา pour plate แล้วเก็บที่ 4°C

11. การเตรียมสีย้อม PAS

ละลาย basic fuchsin จำนวน 1 กรัม ในน้ำปริมาตร 80 ml จากนั้นเติม $NaHSO_3$ จำนวน 2 g (หรือ NaS_2O_5 จำนวน 1.9 g) เติม 1N HCl 20 ml เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมผงถ่านจำนวน 500 mg เขย่าเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายจะมีสีอ่อน และใสไม่มีตะกอน จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C ช่วงที่เก็บไว้ในตู้เย็นอาจมีตะกอนซึ่งสามารถกรองออกได้ สามารถเก็บไว้ได้นานจนสีของสารละลายเป็นสีชมพูอ่อน

12. การเตรียมสีย้อมไขมัน sudan black B

ละลาย sudan black B จำนวน 0.7 g ใน popylene glycol จำนวน 100 ml จากนั้นให้ความร้อน จนกรทั่งอุณหภูมิถึง 100-110°C ไม่ควรเกิน 110°C กรองสารละลายดังกล่าวในขณะที่ยังร้อนผ่านกระดาษ what man No. 2 แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

13. การย้อมโปรตีน

แผ่นเจลที่ได้จากการทำ PAGE แล้วนำมาตรึงโปรตีนด้วย 40% Methanol ใน 10% Acetic acid เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยโคแมสซีบลู R (Coomassie brillient blue R 250 จำนวน 0.2 g ใน 50% methanol) นาน 1 ชั่วโมง ล้างสีย้อมด้วยสารละลาย ซึ่งประกอบด้วย 40% Methanol และ 10% Acetic acid จนพื้นหลังปราศจากสีย้อมและเห็นแถบของโปรตีนชัดเจนขึ้น

14. การย้อมไขมัน (SudanBlack B stain)(George Clark,1981)

หลังจากตรึงโปรตีนด้วย 40% Methanol ใน 10% acetic acid แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นแช่พร้อมเขย่าแผ่นเจลใน Propylene glycol 2-3 นาที จากนั้นย้ายแผ่นเจลมาแช่ในสีย้อมไขมัน SudanBlack B (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 5-7 นาทีหรือจนแถบสีดำของสารที่เป็นไขมันชัดเจน จากนั้นล้างใน 85% Propylene glycol 2-3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ 3-5 นาที หรือจนเห็นแถบสีชัดเจน

15. การย้อมน้ำตาล (Periodic Acid Leucofuchsin (PAS) Method)(George Clark, 1981)

หลังจากตรึงโปรตีนด้วย 40% Methanolใน 10% Acetic acid แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นแช่พร้อมเขย่าแผ่นเจลใน 1% Periodic Acid (H_5IO_6) นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที แล้วย้ายแผ่นเจลมาแช่ในสีย้อม PAS (ภาคผนวก ก) นาน 10 นาที หรือจนเห็นแถบสีแดง จากนั้นแช่แผ่นเจลใน 0.52% $NaHSO_3$ เป็นเวลา 2 นาที 3 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำจนพื้นหลังมีสีชมพูอ่อนและมองเห็นแถบของน้ำตาลซึ่งย้อมติดสีชมพูชัดเจน

16. การเตรียม mRNA (QIAGEN, USA)

นำ total RNA (0.5 mg) จำนวน 250 µl เติมบัฟเฟอร์ OBB (37°C) (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA., 0.2% SDS) จำนวน 250 µl เติม oligotex suspension (37°C) (10% w/v ใน 10 mM Tris-HCl,pH 7.5, 0.5M NaCl, 1 mM EDTA., 0.1% SDS, 0.1% sodium azide) ดูดส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ pipette แล้วนำมาบ่มที่ 70°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมาบ่มที่ 20-30°C นาน 10 นาที นำมาปั่นที่ 14,000-18,000 g เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอน mRNA ในบัฟเฟอร์ OW2 (10 mM Tris-HCl,pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) จำนวน 400 µl นำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน spin คอลัมน์แล้วปั่นที่ 14,000 g นาน 1 นาที จากนั้นย้าย คอลัมน์ลงในหลอดใหม่แล้วล้างตะกอน RNA ด้วยบัฟเฟอร์ OW2 อีกครั้ง จากนั้นให้ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดใหม่แล้วละลาย mRNA ด้วยบัฟเฟอร์ OBB (70°C) จำนวน 50 µl ใช้ pipette ผสมโดยดูดขึ้นลง 3-4 ครั้ง แล้วนำมาปั่นที่ 14,000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ OBB (70°C) อีกครั้งจำนวน 20 µl แล้วนำมาปั่นที่ 14,000 g นาน 1 นาที mRNA ที่ได้จะนำมาวัดความเข้มข้นแล้วนำมาใช้ในการทำ cDNA ต่อไป

17. การตรวจหาปริมาณโปรตีน (Lowry *et al.*, 1951)

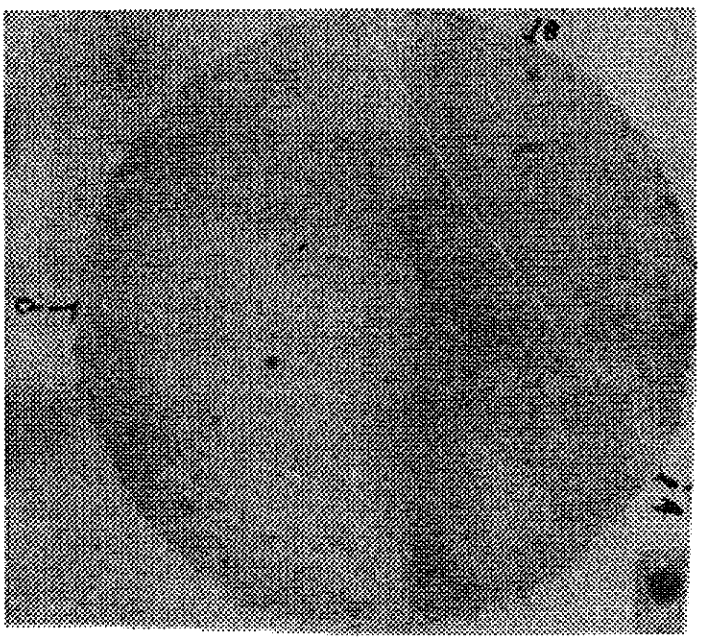
เติมสารละลายโปรตีนจำนวน 10 µl ลงในหลอดทดลอง จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 200 µl ด้วยน้ำกลั่น เติม Reagent A (Alkaline coper tartate Solution บริษัท BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA) ลงไปจำนวน 125 µl จากนั้นเติม Reagent B (Folin Reagent บริษัท BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA) ลงไปจำนวน 1 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างเป็น blank และใช้ Bovine Serum Albumim (BSA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบค่าจากสารตัวอย่าง

ภาคผนวก ข

1. ตารางแสดง ผลการ BLAST ของโปรตีน oli 1 กับ GenBank database

โปรตีน	ผลการ BLAST	%Identities
Oli 1 Length = 81	putative eyestalk molt-inhibiting hormone [*Metapenaeus ensis*] Length = 105	30/30 (100%)
	molt-inhibiting hormone precursor - *Penaeus japonicus* Length = 105	30/30 (100%)
	gonad-inhibiting hormone [*Metapenaeus ensis*] Length = 102	25/30 (83%)
	vitellogenesis inhibiting hormone, Hoa-VIH I, Hoa-VIH II [*Homarus americanus*=lobsters, Peptide, 76 aa] Length = 76	17/30 (56%)
	crustacean hypoglycemic hormone A* [*Orconectes limosus*] Length = 135	15/29 (51%)

2. ภาพจากแผ่น film X-ray แสดงผลการ Hybridized ครั้งที่ 2



3. **ตารางแสดง ผลการ** BLAST **ของ** DNA **ของโคลน กับ** GenBank database

DNA	ผลการ Blast	%Identities
M1	*Homo sapiens* 3 BAC RP11-94I16 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence Length = 156054	24/25 (96%)
M2	*Homo sapiens* chromosome 15, clone RP11-655F8, complete sequence Length = 173062	19/19 (100%)
M3	*Schizosaccharomyces pombe* chromosome II cosmid c1685 Length = 37386	43/48 (89%)
M6	*Homo sapiens* chromosome8, clone RP11-594N15, complete sequence, Length =182860	20/20 (100%)
M7	*Ictalurus punctatus* ribosomal protein L38 mRNA, complete cds Length = 268	54/62 (87%)
M8	*Ictalurus punctatus* ribosomal protein L34 mRNA, complete cds Length = 408 Strand	47/55 (85%)
M9	*Homo sapians* 3 BAC RP11-754J20, Length=185326	20/20 (100%)
M10	Opsin(*Procambarus clarki*=crafishs, retinas, mRna,Length= 1337	79/86 (91%)
M11	*Homo sapiens* chromosome8, clone RP11-398G24, complete sequence, Length =189041	24/25(96%)

3. **ตารางแสดง ผลการ** BLAST **ของ** DNA **ของโคลน กับ** GenBank database (ต่อ)

DNA	**ผลการ** Blast	%Identities
M13	Opsin(*Procambarus clarki*=crayfishs, retinas, mRna,Length= 1337	79/86 (91%)
152	*Spodoptera frugiperda* ribosomal protein L39 mRNA, Length=255	34/34%(100%)