การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 500 ml

Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	5	กรัม
Sodium chloride	2.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ 2X YT ปริมาตร 500 ml

Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	8	กรัม
Sodium chloride	2.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

3. เตรียมยาปฏิชีวนะ 100 mg/ml Ampicillin

ชั่ง Ampicillin sodium salt 100 mg เติมน้ำที่ปราศจากเชื้อ 1 ml เขย่าให้ละลาย เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

4. เตรียมสารละลาย 3 M Sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 1 L

ชั่ง Sodium acetate 408.1 กรัม เติมน้ำ 800 ml คนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 5.2 โดยใช้ Glacial acetic acid จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 L ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. เตรียมสารละลาย PBS pH 7.4 ปริมาตร 1 L

ละลาย Sodium chloride 8.0 กรัม Potassium chloride 0.2 กรัม Na2HPO4 1.44 กรัม และ KH2PO4 0.24 กรัม ในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย Sodium hydroxide ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

6. เตรียมสารละลาย SDS-PAGE

6.1. เตรียม 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 ปริมาตร 100 ml

ชั่ง Tris base 18.17 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 80 ml ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

6.2. เตรียม 1.0 M Tris-HCl pH 6.8 ปริมาตร 100 ml

ชั่ง Tris base 12.10 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 80 ml ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

6.3. เตรียม 30% Acrylamide-bisacrylamine ปริมาตร 100 ml

ชั่ง Acrylamide 29 กรัม และ N,N'-methylene-bis-acrylamide 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 ml คนให้เข้ากัน และให้ความร้อนจนละลายหมด กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บในขวดสีชา

6.4. เตรียม 10% SDS ปริมาตร 100 ml

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

6.5. เตรียม 10% Ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 1 ml

ชั่ง APS 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ml เก็บในตู้เย็น

6.6. เตรียม Tris-glycine electrophoresis buffer (running buffer) ปริมาตร 1 L

ชั่ง SDS 1 กรัม Glycine 14.42 กรัม และ Tris base 3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 L

6.7. เตรียมสารละลายสำหรับย้อมเจล SDS-PAGE ปริมาตร 1 L

ชั่ง Coomassie blue R-250 2 กรัม ละลายใน 95% Methanol 525 ml และ Glacial acetate acid 75 ml ปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น

6.8. เตรียมสารละลายสำหรับล้างสี Destaining I ปริมาตร 1 L

ตวง 95% Methanol 525 ml และ Glacial acetate acid 75 ml ปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น

6.9. เตรียมสารละลายสำหรับล้างสี Destaining II ปริมาตร 1 L

ตวง 95% Methanol 52.5 ml และ Glacial acetate acid 75 ml ปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น

6.10.เตรียม 2X sample buffer ปริมาตร 10 ml

10% SDS	4	ml
100% Glycerol	2	ml
1M Tris-HCl (pH 6.8)	1.2	ml
1M DTT	2	ml
Bromophenol	0.002	g

ปรับปริมาตรเป็น 10 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

7. เตรียมสารละลาย 1 M IPTG

ชั่ง IPGT 2.38 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 10 ml เก็บที่ -20 °C

8. เตรียมสารละลายสำหรับสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

8.1. สารละลาย I ปริมาตร 50 ml

ชั่ง Tris 0.15 กรัม ละลายน้ำ 30 ml ปรับ pH เป็น 8 ด้วย HCl เติม Glucose 0.45 กรัม และ EDTA 0.19 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 50 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

8.2. สารละลาย II ปริมาตร 10 ml (เตรียมก่อนใช้)

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

8.3. สารละลาย III ปริมาตร 50 ml

ชั่ง Potassium acetate 14.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เติม Glacial acetic acid 5.9 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 ml

9. สารละลายสำหรับทำการย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรน Transfer buffer

ชั่ง glycine 14.4 กรัม และ Tris 3.027 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.3 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เวลาใช้ให้แบ่งออกมา 80 มิลลิลิตร เติม absolute methanol 20 ml

10. สารละลายสำหรับทำการทดสอบโปรตีนกับซีรัม (Immunoblotting)

10.1. สารละลาย TBS buffer

ชั่ง NaCl 8 กรัม KCI 0.2 กรัม และ Tris 3 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml

10.2. สารละลาย TBST buffer

เติม Tween 20 500 ไมโครลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS 1 ลิตร

10.3. สารละลาย Blocking buffer

เติม skimmed milk 1 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBST 50 มิลลิลิตร

10.4. สารละลายสำหรับเอมไซม์ Alkaline phosphatase (Detection buffer)

ชั่ง NaCl 1.17 กรัม $MgCl_2$ 0.2 กรัม และ Tris Cl 2.42 กรัม เติมน้ำ 150 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 9.5 ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

10.4.1. เตรียมสารตั้งต้นสำหรับเอมไซม์

1) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)
   BCIP 0.5 กรัม ละลายใน 100% dimethylformamide 10 มิลลิลิตร
2) Nitro blue tetrazolium (NBT)
   NBT 0.5 กรัม ละลายใน 70% dimethylformamide 10 มิลลิลิตร