การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายและบัฟเฟอร์

1. การเตรียม K-199

การเตรียม M-199

ใช้ M-199 จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จำนวน 500 มิลลิลิตร (2x) แล้วเติม $NaHCO_3$ จำนวน 2.2 กรัม

การเตรียม K-199 ประกอบด้วย

M-199 ที่ยังไม่ปรับ pH จำนวน 50 มิลลิลิตร

Salt mixture จำนวน 10 มิลลิลิตร (0.05 KCl, 0.12 M $MgSO_4.7H_2O$, 0.16 M $MgCl_2.6H_2O$, 4.16 M $NaH_2PO_4.2H_2O$)

1.88 M NaCl จำนวน 10 มิลลิลิตร

0.16 M $CaCl_2.2H_2O$ จำนวน 10 มิลลิลิตร

0.1 M L-glutamine จำนวน 1 มิลลิลิตร

10 M Hepes ใน K-199

น้ำกลั่น 19 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.3-7.6 และกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

2. การเตรียม KC-199

ใช้ K-199 ผสมกับ 3% L-Cysteine เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

3. 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

4. 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

5. การเตรียมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

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

ละลาย Sodium chloride 8.0 กรัม Potassium chloride 0.2 กรัม Na_2HPO_4 1.44 กรัม และ KH_2PO_4 0.24 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วยสารละลาย Sodium hydroxideปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. การเตรียมสารละลาย 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 sulfate (SDS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.5 การเตรียม 10% Ammonium persulfate (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 3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 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 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8.8 การเตรียมสารละลาย Destaining I ปริมาตร 1 ลิตร

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

8.9 การเตรียมสารละลาย Destaining II ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 95% Methanol 5.26 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตรปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

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. การเตรียมสารละลายสำหรับสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

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 แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10.2 สารละลาย II ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

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

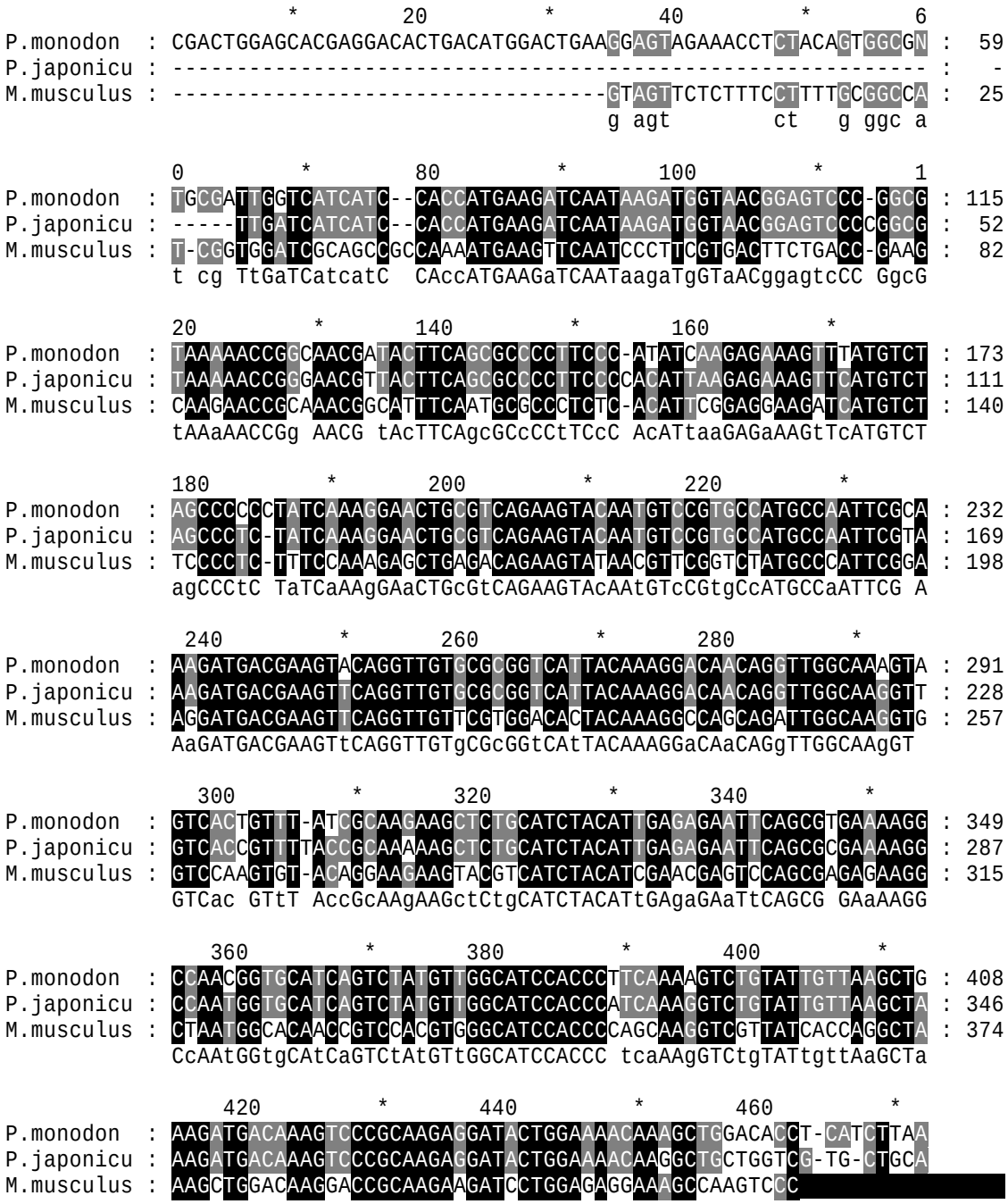
10.3 สารละลาย III ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

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 แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน ribosomal L26 (RPL26) ของกุ้งกุลาดำ *(P. monodon)* Accession no. AY680836

```
   1 CGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAACCTCTACAGTGGCGNT

  61 GCGATTGGTCATCATCCACCATGAAGATCAATAAGATGGTAACGGAGTCCCGGCGTAAAA
                           M  K  I  N  K  M  V  T  E  S  R  R  K  N

 121 CCGGCAACGATACTTCAGCGCCCCTTCCCATATCAAGAGAAAGTTTATGTCTAGCCCCCC
       R  Q  R  Y  F  S  A  P  S  H  I  K  R  K  F  M  S  S  P  L

 181 TATCAAAGGAACTGCGTCAGAAGTACAATGTCCGTGCCATGCCAATTCGCAAAGATGACG
       S  K  E  L  R  Q  K  Y  N  V  R  A  M  P  I  R  K  D  D  E

 241 AAGTACAGGTTGTGCGCGGTCATTACAAAGGACAACAGGTTGGCAAAGTAGTCACTGTTT
       V  Q  V  V  R  G  H  Y  K  G  Q  Q  V  G  K  V  V  T  V  Y

 301 ATCGCAAGAAGCTCTGCATCTACATTGAGAGAATTCAGCGTGAAAAGGCCAACGGTGCAT
       R  K  K  L  C  I  Y  I  E  R  I  Q  R  E  K  A  N  G  A  S

 361 CAGTCTATGTTGGCATCCACCCTTCAAAAGTCTGTATTGTTAAGCTGAAGATGACAAAGT
       V  Y  V  G  I  H  P  S  K  V  C  I  V  K  L  K  M  T  K  S

 421 CCCGCAAGAGGATACTGGAAAACAAAGCTGCTGGTCGGGCTGCAGCTCAGGGCAAAGACA
       R  K  R  I  L  E  N  K  A  A  G  R  A  A  A  Q  G  K  D  K

 481 AGGAGAAGTTCACTGCTATGGACACCTCATCTTAAATACAGATCTTGTGATTAAAAAAAA
       E  K  F  T  A  M  D  T  S  S  *

 541 AAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

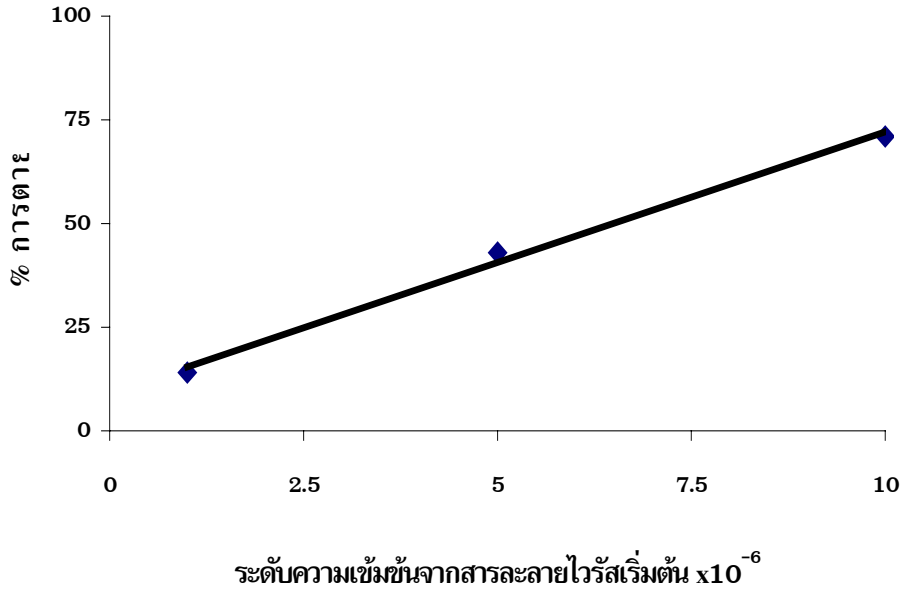
เปรียบเทียบระดับเบส (Nucleotide aligement) ของยีน RPL26 ระหว่าง *P. monodon*, (Accession no. AY680836) *P. japonicus* (Accession no. AU175457) และ *Mus musculus* (Accession no. X80699)



เปรียบเทียบระดับกรดอะมิโน (amino acid aligement) ของยีน RPL26 ระหว่าง *P.monodon* (PmL26), *P.japonicus* (PjL26) และ *Mus musculus* (mouseL26)

```
                    *         20         *         40         *         60
PjL26     : MKINKMVTESRRKNRERYFSAPSHIKRKFMSSPLSKELRQKYNVRAMPIRKDDEVQVVRGHY : 62
PmL26     : MKINKMVTESRRKNRQRYFSAPSHIKRKFMSSPLSKELRQKYNVRAMPIRKDDEVQVVRGHY : 62
mouseL26  : MKFNPFVTSDRSKNRKRHFNAPSHIRRKIMSSPLSKELRQKYNVRSMPIRKDDEVQVVRGHY : 62
            MKiNkmVTesRrKNR RyFsAPSHI4RKfMSSPLSKELRQKYNVRaMPIRKDDEVQVVRGHY

                   *         80         *        100         *        120
PjL26     : KGQQVGKVVTVYRKKLCIYIERIQREKANGASVYVGIHPSKVCIVKLKMTKSRKRILENKAA : 124
PmL26     : KGQQVGKVVTVYRKKLCIYIERIQREKANGASVYVGIHPSKVCIVKLKMTKSRKRILENKAA : 124
mouseL26  : KGQQIGKVVQVYRKKYVIYIERVQREKANGTTVHVGIHPSKVVITRLKLDKDRKKILERKAK : 124
            KGQQ6GKVVtVYRKKlcIYIER6QREKANGa3VyVGIHPSKVcIv4LK6tKsRK4ILEnKAa

                  *       140
PjL26     : GRAAAQGKDKEKFTAMDTSS- : 144
PmL26     : GRAAAQGKDKEKFTAMDTSS- : 144
mouseL26  : SRQVGKEKGKYKEETIEKKMQ : 145
            gRaaaqgKdKeKfta6dtss
```

กราฟแสดงการหาระดับความเข้มข้นของสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ที่ทำให้กุ้งมีอัตรการตายร้อยละ 50 ในระยะเวลา 3-5 วัน (LD50)



ตารางอัตราการมีชีวิตรอด

ตารางผนวก 1 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $7x10^{-6}$ หลังได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IVH 4.5 ไมโครกรัม/ตัว

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
วันที่	1	2	3*	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
กลุ่มควบคุม	100	100	100	100	100	86.7	80.0	73.3	60.0	46.7	33.3	33.3	26.7	26.7	20.0
กลุ่มฉีด IVH	100	100	100	100	100	93.3	86.7	86.7	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	60.0

ตารางผนวก 2 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IVH 4.5 ไมโครกรัม/ตัว

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
วันที่	1	2	3 *	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
กลุ่มควบคุม	100	100	100	100	100	93.3	60.0	46.7	40.0	26.7	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3
กลุ่มฉีด IVH	100	100	100	100	100	100	100	73.3	73.3	60.0	53.3	53.3	53.3	53.3	53.3

ตารางผนวก 3 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 225 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
วันที่	1	2	3 *	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
อาหารปกติ	100	93.3	93.3	93.3	93.3	60.0	40.0	26.7	6.7	0	0	0	0	0	0
อาหารผสม IVH	100	100	100	100	100	100	93.3	73.3	60.0	46.7	46.7	40.0	40.0	40.0	33.3

ตารางผนวก 4 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
วันที่	1	2	3 *	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
อาหารปกติ	100	93.3	93.3	93.3	93.3	80.0	53.3	46.7	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
อาหารผสม IVH	100	100	100	100	100	100	93.3	73.3	60.0	46.7	46.7	40.0	40.0	40.0	33.3

ตารางผนวก 5 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
	วันที่ 1	2	3 *	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
อาหารปกติ	100	100	100	93.3	93.3	80.0	50.0	53.3	40.0	33.3	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
อาหารผสม IVH	100	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	86.7	80.0	73.3	46.7	46.7	46.7	46.7	46.7	46.7

ตารางผนวก 6 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ จำนวน 1 ครั้งในวันที่ 3 หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
	วันที่ 1	2	3*	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
อาหารปกติ	100	100	100	100	100	86.7	40.0	20.0	0	0	0	0	0	0	0
อาหารผสม IVH	100	100	100	100	100	100	73.3	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0

ตารางผนวก 7 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ จำนวน 2 ครั้งในวันที่ 3 และ 15 หลังได้รับอาหารผสมสาร IVH 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
	วันที่ 1	2	3 *	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*
อาหารปกติ	100	100	100	100	100	80.0	20.0	0	0	0	0	0	0	0	0
อาหารผสม IVH	100	100	100	100	100	100	73.3	66.7	66.7	66.7	66.7	60.0	60.0	60.0	60.0

ตารางผนวก 7 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
	วันที่ 16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
อาหารปกติ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
อาหารผสม IVH	53.3	53.3	53.3	53.3	53.3	53.3	53.3	53.3	46.7	40.0	26.7	20.0	20.0	20.0	20.0

* ฉีดด้วยเชื้อไวรัส WSSV

ตารางผนวก 8 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน ปริมาณ 4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักกุ้ง

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
	วันที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ฉีด PBS	100	93.3	33.3	20.0	13.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ฉีด GST	86.7	73.3	46.7	40.0	33.3	20.0	6.7	0	0	0	0	0	0	0	0
ฉีด GST-RPL26	100	86.7	66.7	53.3	26.7	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3	13.3

ตารางผนวก 9 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน ปริมาณ 16 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักกุ้ง

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
	วันที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ฉีด PBS	100	93.3	33.3	20.0	13.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ฉีด GST	73.3	60.0	33.3	13.3	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7
ฉีด GST-RPL26	100	86.7	80.0	73.3	73.3	73.3	73.3	73.3	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7

ตารางผนวก 10 อัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากเชื้อไวรัส WSSV ที่ความเข้มข้น $9x10^{-6}$ หลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน ปริมาณ 32 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักกุ้ง

กลุ่มทดลอง	อัตราการมีชีวิตรอด (%)														
	วันที่ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ฉีด PBS	100	93.3	33.3	20.0	13.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ฉีด GST	100	86.7	46.7	40.0	20.0	6.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ฉีด GST-RPL26	100	86.7	53.3	40.0	40.0	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.33