ภาคผนวก ก.

อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Arabinose agar

Minimal salts solution ประกอบด้วย ammonium chloride 20 กรัม ammonium nitrate 4 กรัม anhydrous sodium sulphate 8 กรัม dipotassium hydrogen orthophosphate 12 กรัม dihydrogen orthophosphate 4 กรัม magnesium sulphate 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2% agar ชั่งอาหาร agar 2 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

10% L-arabinose ชั่ง arabinose 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ผสมสารละลาย minimal salt solution 25 มิลลิลิตร 2% agar 75 มิลลิลิตร และ 10% arabinose 2 มิลลิลิตร

2. Glucose agar

เตรียม Minimal salts solution, 2% agar ตามข้อ 1. และเตรียม 10% glucose โดยชั่ง glucose 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ผสมสารละลาย minimal salt solution 25 มิลลิลิตร 2% agar 75 มิลลิลิตร และ 10% glucose 2 มิลลิลิตร

3. LB broth

ชั่ง Tryptone 5 กรัม Yeast extract 2.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม ละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. Muller Hinton blood agar (MHBA)

ชั่งอาหาร MHA 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มให้เดือดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมเลือด 50 มิลลิลิตร

5. Muller Hinton agar (MHA)

ชั่งอาหาร MHA 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มให้เดือดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. Nutrient agar (NA)

ชั่งอาหาร NA 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มให้เดือดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

7. Skim milk agar

ส่วน A ชั่งอาหาร NA 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ส่วน B ชั่ง Lithmus milk 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้ละลาย นำส่วน A และ B นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

8. Starch agar

ชั่งอาหาร starch 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

9. Tributyrin agar

ชั่งอาหาร NA 2 กรัม เติม tributyrin 2 มิลลิลิตร Tween 20 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

10. Trypticase Soy broth (TSB)

ชั่งอาหาร TSB 30 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมี

1. 0.5M Tris-HCl, pH6.8

ชั่ง Tris 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 6.8 ด้วย conc. HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 1.5M Tris-HCl, pH8.8

ชั่ง Tris 18 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 8.8 ด้วย conc. HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. 10% ammonium persulfate เตรียมใหม่ทุกครั้ง

ชั่ง ammonium persulfate 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร

4. 30%สารละลาย acrylamide

ชั่ง acrylamide 30 กรัม ผสมกับ N,N methylene bisacrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเก็บไว้ในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. 50mM Tris-HCl, pH7.5 เตรียมจาก

Stock 0.1M Tris : ชั่ง Tris base 1.2114 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

0.1M HCl : ผสมน้ำกลั่น 991.7 มิลลิลิตรกับ conc. HCl 8.3 มิลลิลิตร

ผสม stock 0.1M Tris 50 มิลลิลิตร และ 0.1M HCl 40.3 มิลลิลิตร ปรับให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นนำ 0.1M Tris-HCl, pH7.5 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

6. 5X อิเล็กโทรฟอรีซิส บัฟเฟอร์ (electrophoresis buffer) สำหรับ Native PAGE , pH 8.3

ชั่ง Tris base 9 กรัม glycine 43.2 กรัม ละลายในน้ำปราศจากอิออน 600 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลาใช้เจือจาง 5X stock 60 มิลลิลิตร กับน้ำปราศจากอิออน 240 มิลลิลิตร สำหรับการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส 1 ครั้ง

7. สารละลายแบรดฟอร์ด

ชั่งสาร coomassie brilliant blue G-250 0.01 กรัม ละลายใน ethanol anhydrous 4.7 มิลลิลิตร จนละลายหมดแล้วเติม phosphoric acid 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman NO.1 เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. สีย้อมคูมาซี บริลเลี่ยน บลู (coomassie brilliant blue staining solution)

ชั่ง coomassie brilliant blue R-250 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรจากนั้นเติมกรดแอซีติก 50 มิลลิลิตร และเมธานอง 200 มิลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

9. บัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) ประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู

10. การย้อมสีโปรตีน

ย้อมสีโปรตีนในแผ่นวุ้นด้วยสีคูมาซีบลู (coomassie brilliant blue R-250) โดยแช่วุ้นในสารละลาย 0.08% คูมาซีบลู-50% เมธานอล -7.5% กรดแอซีติก ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 18% เมธานอล-7.5% กรดแอซีติก จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน