ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria Bertani (LB) Agar

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

การเตรียม : ชั่ง LB agar 35 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มพอวุ้นละลาย อย่าให้เดือดมาก นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ : เติม NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

2. Luria Bertani (LB) broth

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Yeast extract	10	g
Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
น้ำกลั่น	1	L

การเตรียม : ชั่ง LB agar 20 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

หมายเหตุ : เติม NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

3. 1%, 3% NaCl

การเตรียม : ชั่ง NaCl 1 g และ 3 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

4. 0, 0.5, 1, 3, 6, 8, 10% NaCl + Nutrient broth

ส่วนประกอบต่อ 100 ml

ชั่ง Nutrient broth 0.8 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml โดยไม่ต้องเติมเกลือสำหรับ 0% NaCl ส่วนความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0.5-10% NaCl ก็เติมเกลือตามความเข้มข้นตามลำดับ ต้มด้วยไฟอ่อนๆ แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

5. Mueller Hinton agar

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Beef infusion	300	g
Casamino acids	17.5	g
Starch	1.5	g
Agar	17	g

การเตรียม : ชั่ง Mueller Hinton agar 38 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 25x150 ml ในปริมาตร 25 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50 °C เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

หมายเหตุ : เติม NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

6. swarming agar

การเตรียม : ชั่ง Bacto tryptone 10 g, NaCl 30 g, Bacto agar 3 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 25x150 ml ในปริมาตร 15 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50°C เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

7. Urea agar base

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Pancreatic digest of gelatin	1	g
Yeast extract	3	g
Dextose	1	g
Sodium chloride	5	g
Urea	20	g
Potassium phosphate	2	g
Phenol red	0.012	g

การเตรียม : ชั่ง urea agar base 29 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการกรอง จากนั้นละลาย agar 15 g ในน้ำ 900 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิ agar ลดลงเหลือ 45-55°C จึงเติม 100 ml ของ urea agar base แล้วนำไปเทใส่หลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 3.5 ml

หมายเหตุ : เติม NaCl เพิ่ม 5 g (1% NaCl) ในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารละลาย

1. Blocking solution

เจือจาง 10x blocking solution (ขวด No.6) เป็น 1x blocking solution ด้วย Maleic acid buffer

หมายเหตุ : ใช้ชุดทดสอบ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของ Roche

2. Denature solution

ส่วนผสมต่อ 1 ลิตร

1.5 M NaCl	87.66	g
0.5 M NaOH	20.0	g
น้ำกลั่น	1	L

3. DIG solution

ปั่น Anti-Digoxigenic-AP (ขวด No. 4) 5 นาที ที่ความเร็ว 10,000 rpm ก่อนใช้ หลังจากนั้นปิเปตด้วยความระมัดระวังให้ดูดเท่าที่ต้องใช้จากส่วนบนของ solution เจือจาง Anti-Digoxigenic-AP เป็น 1:5,000 (150 mU/ml) ด้วย blocking solution

หมายเหตุ : ใช้ชุดทดสอบ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของ Roche

4. Detection solution

ส่วนประกอบต่อ 100 ml

NaCl	0.58	g
Tris	1.21	g
น้ำกลั่น	100	ml

ปรับจนกระทั่งได้ pH 9.5

5. 1 M EDTA

ชั่ง EDTA 372.2 g ในน้ำ 800 ml กวนอย่างแรงโดยใช้ magnetic stirrer เติมเกล็ด sodium hydroxide จนกระทั่งได้ pH 8.0 ซึ่ง EDTA สามารถละลายได้หมดพอดี ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไป autoclave ด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

6. Ethidium bromide (10 mg/ml)

ชั่ง ethidium bromide 1 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนโดยใช้ magnetic stirrer จนกว่าจะละลาย (ใช้เวลาหลายชั่วโมง) เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ต้องสวมถุงมือระหว่างการเตรียม ระวัง อย่าหายใจเอาผง ethidium bromide ระหว่างการชั่ง

7. Hybridization solution

ละลาย DIG Easy Hyb Granules (ขวด No. 7) ด้วย sterile double distilled water 64 ml โดยเติมน้ำก่อนครึ่งหนึ่งใช้ stirring คนให้ละลาย 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเริ่มละลายดีให้เติมน้ำส่วนที่เหลือ ดูด solution ที่ละลายดีแล้วผสมกับ DIG-labeled DNA probe ตามความเข้มข้นที่กำหนด DIG-labeled DNA probe ก่อนใช้ต้องนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที และจุ่มในน้ำแข็งทันทีอีก 5 นาที เพื่อให้ DNA probe แยกเป็นสายเดี่ยว

หมายเหตุ : ใช้ชุดทดสอบ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของ Roche

8. Loading dye

ชั่ง bromphenol blue 0.25 g และ sucrose 4 g ละลายในน้ำ 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

9. Maleic acid

ส่วนประกอบต่อ 500 ml

Maleic acid	5.8	g
NaCl	4.38	g
น้ำกลั่น	500	ml

ปรับจนกระทั่งได้ pH 7.5

10. Neutralization solution

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

1.5 M NaCl	87.66	g
0.5 M Tris, pH 7.2	60.57	g
น้ำกลั่น	1	L

ปรับจนกระทั่งได้ pH 7.5

11. NBT/BCIP color solution

ใส่ 40 µl ของ NBT/BCIP stock solution (ขวด No. 5) ใน 2 ml ของ detection buffer เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อจะใช้และเก็บในที่มืด

หมายเหตุ : ใช้ชุดทดสอบ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของ Roche

12. Phenol : Chloroform : isoamyl (25 : 24 : 1)

ผสม isoamyl และ chloroform ในอัตราส่วน 24: 1 ผสมให้เข้ากันดี หลังจากนั้นเติม melted phenol ในอัตราส่วน 25 ผสมให้เข้ากันดี แล้วเติม 0.1 M Tris HCl pH 8.0 เขย่าแรงๆ ให้ผสมกันทิ้งไว้ 1 วัน ปล่อยให้แยกชั้น เก็บในขวดสีชาที่ 4°C

13. Phosphate buffer solution (PBS) pH 8.0

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

Na_2HPO_4	1.44	g
Sodium chloride	8	g
KCl	0.2	g
KH_2PO_4	0.2	g
น้ำกลั่น	1	L

การเตรียม : ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

14. Prehybridization solution

ละลาย DIG Easy Hyb Granules (ขวด No. 7) ด้วย sterile double distilled water 64 ml โดยเติมน้ำก่อนครึ่งหนึ่งใช้ stirring คนให้ละลาย 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเริ่มละลายดีให้เติมน้ำส่วนที่เหลือ

หมายเหตุ : ใช้ชุดทดสอบ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของ Roche

15. 10% SDS

ชั่ง SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 100 ml อุ่นเล็กน้อยเพื่อให้ละลายดีขึ้น นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

16. 3M Sodium acetate

ละลาย Sodium acetate trihydrous 408.1 g ด้วยน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ด้วย glacial acetic จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

17. 10x SSC

ส่วนประกอบต่อ 1 ลิตร

3 M NaCL	87.5	g
0.3 M Na-citrate dihydrate	44.1	g
น้ำกลั่น	1	L

ปรับจนกระทั่งได้ pH 7.4

18. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับ electrophoresis (Tris borate buffer 10x TBE)

ชั่ง Tris base 108 g และ boric acid 55 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 ml ต้มพอละลายอย่าให้เดือด เติม 0.5 M EDTA pH 8.0 จำนวน 40 ml และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำไปใช้ให้เจือจางในระดับความเข้มข้น 1:10 (TBE) และ 1:20 (0.5x TBE)

19. Tris EDTA (TE)

ผสมสารละลาย 10 mM Tris-HCl และสารละลาย 1 mM EDTA โดยการละลาย Tris-HCl จำนวน 1.211 g ในน้ำกลั่น และเติมสารละลาย 0.5 M EDTA 1 ml ปรับ pH เป็น 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที

20. Washing solution

ส่วนประกอบต่อ 500 ml

Maleic acid	5.8	g
NaCl	4.38	g
Tween-20	1.5	ml
น้ำกลั่น	500	ml

ปรับจนกระทั่งได้ pH 7.4

หมายเหตุ : เติม Tween-20 หลัง autoclave แล้ว

การเตรียมเอนไซม์

21. เอนไซม์ RNase (10 mg/ml)

ชั่งเอนไซม์ RNase 100 mg ละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 15 mM sodium chloride ปริมาตร 10 ml ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20°C