ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. วิธีการเตรียมสารเคมี

1.1 EDTA 0.5 M pH 8.0

ละลาย EDTA 16.81 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติม สารละลายกรด HCl เข้มข้นให้ได้ pH 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.2 Tris-Boric-EDTA buffer 10x

ละลาย Tris base 108 กรัม boric acid 55 กรัม ในสารละลาย 0.5 M EDTA pH 8.0 40 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เจือจางเป็นสารละลายเข้มข้น 1x ด้วยน้ำกลั่นสำหรับใช้เป็น electrophoresis buffer

1.3 Electrophoresis dye 6X

ละลาย bromphenol blue 0.025 กรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำ deionized 5 มิลลิลิตร แล้วเติม xylene eyanol 0.025 กรัม คนให้ละลาย และเติม glycerol 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และแบ่งใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 PBS pH 7.4

ละลาย NaCl 8.0 กรัม KCl 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 NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.5 Tris 50 mM ใน Calcium acetate 1.5 mM

ละลาย Tris 23.73 กรัม และ calcium acetate 0.0237 กรัม ในน้ำ deionized 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.6 Proteinase-K 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย Proteinase-K 0.1 กรัม ในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าขวดเบาๆ จนละลายหมด แบ่งสารละลายใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นที่ –20 องศาเซลเซียส

1.7 Sodium dodesyl sulphate (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำ deionized 90 มิลลิลิตร วางบน hot plate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส คนจนละลายหมด วางไว้จนเย็น แล้วปรับ pH ให้เป็น 7.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

1.8 Proteinase-K-SDS buffer (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

เตรียมส่วนผสมของสารละลายให้มีความเข้มข้นของ proteinase K 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารตั้งต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในข้อ 1.6 และ SDS 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในข้อ 1.7 เติมน้ำ deionized ให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

1.9 Chloroform-Isoamyl alcohol (24:1)

ตวงสารละลาย Chloroform 24 ส่วน และ Isoamyl alcohol 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน ใส่ขวดสีชา เก็บในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

1.10 Ammonium acetate 3 M

ละลาย ammonium acetate 34.68 กรัม ในน้ำ deionized 150 มิลลิลิตร คนให้ละลายกรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรู 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดสีชา เก็บในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

1.11 NaCl 2.5 M

ละลาย NaCl 36.525 กรัม ในน้ำ deionized 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.12 Polyethylene glycol (PEG) 20 เปอร์เซ็นต์

ละลาย PEG 50 กรัมในสารละลาย 2.5 M NaCl ในข้อ 1.11 250 มิลลิลิตร คนจนละลายแล้วกรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรู 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดแก้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.13 Sodium acetate 0.01 M

ละลาย 0.0410 กรัม sodium acetate ในน้ำ deionized 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 5.2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ให้ครบ 50 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.14 Tris-HCl 0.1 M pH 8.0

ละลาย Tris 12.12 กรัม ในน้ำ deionized 80 มิลลิลิตร และค่อยๆ เติมสารละลายกรด HCl เข้มข้น 4.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.15 Tris-EDTA buffer

ผสมสารละลาย Tris-HCl ในข้อ 1.14 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย EDTA ในข้อ 1.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำ deionized ให้ครบ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.16 Rnase A 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย Rnase A 2 มิลลิกรัม ในสารละลาย ในข้อ 1.13 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และสารละลายในข้อ 1.15 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรู 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

1.17 Ethedium bromide 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย ethedium bromide 250 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา หุ้มด้วยกระดาษทึบแสงเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เจือจางสารละลายข้างต้น 0.1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 99.9 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาใช้สำหรับย้อมแผ่น agarose gel

1.18 NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์

ละลาย NaCl 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

1.19 Trypan blue 0.15 เปอร์เซ็นต์

ละลาย trypan blue 0.15 กรัม ในสารละลาย NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยวางบน magnetic stirrer นาน 6-12 ชั่วโมง และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 0.45 มิลลิลิตร

1.20 L-cysteine 3 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมก่อนใช้ในแต่ละครั้ง)

ละลาย L-cysteine 30 กรัมในสารละลาย K-199 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 กรองผ่านเมมเบรนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางรูขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.21 CAC buffer

ละลาย $C_2H_6AsNaO_2.3H_2O$ (Cacodylic acid sodium salt trihydrate) 1.07 กรัม ในน้ำ deionized ปลอดเชื้อ 500 มิลลิลิตร เติม CaCl 0.37 กรัม ปั่นให้ละลายแล้วจึงเติม $MgCl_2$ 5.08 กรัม ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

1.22 Trypsin 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย trypsin (1:250) 0.001 กรัมใน CAC buffer 1 มิลลิลิตร

1.23 L-DOPA 0.003 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine 0.003 กรัมใน CAC buffer 1 มิลลิลิตร

1.24 Folin reagent 1:10

เจือจางสารละลาย folin ด้วยน้ำ deionized ในอัตราส่วน folin 1 ส่วนต่อน้ำ 9 ส่วน ผสมให้เข้ากัน ใส่ขวด เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

1.25 Alkaline copper solution

1. ละลาย $CuSO_4$. $5H_2O$ 0.5 กรัม ในน้ำ deionized 100 มิลลิลิตร
2. ละลาย Na-K- tatrate 1 กรัม ในน้ำ deionized 100 มิลลิลิตร
3. ละลาย Na_2CO_3 1 กรัม ในสารละลาย NaOH 0.5 N 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย 1 2 และ 3 ในอัตราส่วน 1: 1: 50 ให้เข้ากันดีก่อนใช้

1.26 สารละลาย BSA มาตรฐาน

ละลาย bovine serum albumin 1.0 มิลลิกรัม ในน้ำ deionized 10 มิลลิลิตร และเจือจางสารละลายข้างต้นด้วยน้ำ deionized ในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.27 Trichloro acetic acid (TCA) 3 เปอร์เซ็นต์

ละลาย TCA 3 กรัมในน้ำ deionized 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.28 Color reagent

ละลาย thio-urea 1.5 กรัม ใน glacial acetic acid 940 มิลลิลิตร เติม O-tuluidine 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.29 Boric acid 0.2 เปอร์เซ็นต์

ละลาย boric acid 0.2 กรัม ในน้ำ deionized 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.30 Glucose 100 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

ละลาย glucose 0.1 กรัม ในสารละลายข้อ 1.29 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.31 Nitric acid 65 เปอร์เซ็นต์

เจือจางสารละลาย nitric acid จาก 70 เปอร์เซ็นต์ เป็น 65 เปอร์เซ็นต์ โดยตวงสารละลาย nitric acid 92.86 มิลลิลิตรเติมน้ำ deionized ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.32 น้ำยา Davidson's fixative

Ethyl alcohol (95 เปอร์เซ็นต์)	330 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	115 มิลลิลิตร
Formalin	220 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้า และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.33 สีย้อมฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin)

1. Hematoxylin

Hematoxylin crystal	4 กรัม
Sodium iodate	0.8 กรัม
Potassium aluminum sulfate (alum)	100 กรัม
Citric acid	4 กรัม
Chloral hydrate	200 กรัม
น้ำกลั่น	2,000 มิลลิลิตร

ละลาย alum ในน้ำกลั่นจนหมด แล้วจึงใส่ hematoxylin คนให้ละลายจึงเติม sodium iodate ผสมให้เข้ากัน เติม citric acid และ chloral hydrate คนจนสารทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จึงนำมาใช้

2. Eosin

Eosin Y. CI 45380	1 กรัม
Ethyl alcohol (70 เปอร์เซ็นต์)	995 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	5 มิลลิลิตร

ละลาย Eosin 1 กรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร คนจนละลายหมดเติมเอธิลแอลกอฮอล์ ที่เหลือ และเติม glacial acetic acid 5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันดี เก็บสารละลายใส่ขวด