การเตรียมสารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

1. อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

1.1 การเตรียมอาหาร LB (Luria Bertaini) medium (Sambrook, *et al.*, 1989)

Tryptone	10 กรัม
Yeast extracts	5 กรัม
NaCl	5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อ (sterilize) โดยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาทีที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (lb/sq. in)

1.2 การเตรียมอาหาร SOB (SOB medium)

Tryptone	20 กรัม
Yeast extracts	5 กรัม
NaCl	0.5 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร เขย่าจนกระทั่งสารละลายหมด เติมสารละลาย 250 mM KCl 10 มิลลิตร (สารละลาย KCl เตรียมได้จากการละลาย KCl 1.86 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร) ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยสารละลาย 5 M NaOH (ประมาณ 0.2 มิลลิตร) ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและทำให้ปลอดเชื้อ (sterilize) โดยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอ เป็นเวลา 20 นาทีที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1.3 การเตรียมอาหาร SOC (SOC medium)

การเตรียมเหมือนกับอาหาร SOB แต่หลังจากทำการนึ่งอาหาร SOB ในหม้อนึ่งอัดไอน้ำแล้ว ปล่อยให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60°C จากนั้นให้เติมสารละลาย 1M glucose ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (1M glucose เตรียมโดยการละลาย glucose 18 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร หลังจากน้ำตาล glucose ละลาย ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมครอน)

2. การเตรียมรีเอเจนต์อินทรีย์และสารละลายอื่นๆ

2.1 การเตรียม Phenol : Chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 (v/v/v)

ทำการผสม Chloroform และ isoamyl alcohol ด้วยอัตราส่วน 24:1 จากนั้นนำไปผสมกับสารละลาย Phenol อิ่มตัวปริมาตรที่เท่ากัน ส่วนใหญ่จะผสมกับ Phenol อิ่มตัวเมื่อต้องการใช้ ถ้าต้องการเก็บไว้หลังผสมกันแล้ว ให้เติม 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) เพื่อปิดสารละลาย เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

2.2 การเตรียม 1M $CaCl_2$

ละลาย $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 14.7 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์ milli-Q ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำสารละลายให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านฟิลเตอร์ 0.22 ไมครอน และแบ่งเป็นส่วนๆขนาด 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 °C

2.3 0.5M EDTA, pH 8.0

ชั่ง Disodium ethylenediamine tetraacetate $\cdot 2H_2O$ 186.1 กรัม เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนอย่างแรงโดยการใช้แท่งแม่เหล็ก เติมเกล็ด NaOH ลงไปจนได้ pH 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำเป็นเวลา 20 นาทีที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (lb/sq. in)

2.4 การเตรียม Ethidium bromide (10มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง Ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร กวนด้วยการใช้แท่งแม่เหล็ก จนละลาย เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง โดยในขณะเตรียมให้สวมถุงมือและระวังอย่าหายใจเอาผง Ethidium bromide เข้าไป เพราะผง Ethidium bromide มีสมบัติเป็น strong mutagen

2.5 การเตรียม IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside)

ชั่ง IPTG 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านฟิลเตอร์ 0.22 ไมครอน แบ่งสารละลายออกเป็นส่วนๆ ขนาด 1 มิลลิลิตรและเก็บไว้ที่ -20 °C

2.6 การเตรียม X-gal (Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)

ละลาย X-gal 20 มิลลิกรัมใน Dimethylformamide 1 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในหลอดห่อ foil ที่ -20 °C โดยไม่ต้องกรอง สารละลายที่ได้ควรเป็นสารละลายใสไม่มีสี ถ้ามีสีออกเหลืองไม่ควรใช้

2.7 การเตรียม 1M $MgCl_2$

ละลาย $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 203.3 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นและทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาทีที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.8 β-mercaptoethanol

ปกติ β-mercaptoethanol ได้มาในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้น 14.4 M และเก็บในขวดสีชา ที่ 4 °C และห้ามนึ่งสารละลาย β-mercaptoethanol หรือสารละลายที่มี β-mercaptoethanol ในหม้อนึ่ง

2.9 การเตรียมเอนไซม์ RNase A

เตรียมโดยการชั่ง RNase A 10 มิลลิกรัม และละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 10 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่ –20°C เอนไซม์ยังคงทำงานได้ดีแม้จะผ่านการแช่แข็งและละลาย (freeze-thaw) หลายครั้ง

2.10 การเตรียมยาปฏิชีวนะ ampicillin (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก *E. coli* XL-1 Blue MRF′ ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม จะเตรียมเก็บเก็บเป็น stock ที่ –20°C สำหรับยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยการชั่ง ampicillin sodium salt 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร

2.11 การเตรียม 50X TAE buffer

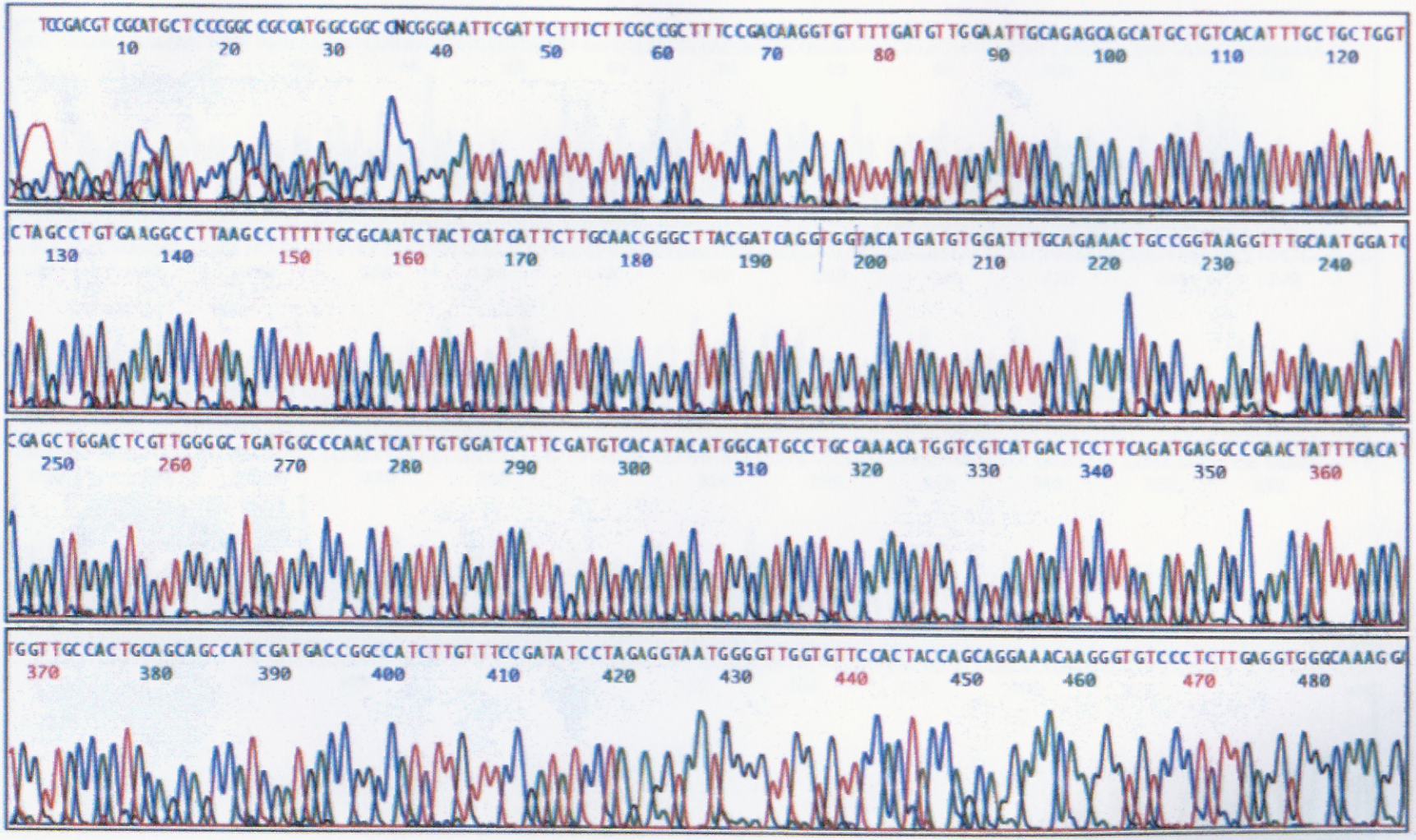
Tris-base	108	กรัม
Glacial acetic acid	55	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำเป็นเวลา 20 นาทีที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.12 การเตรียม 3M Sodium acetate (pH 5.2)

ชั่ง Sodium acetate • $2H_2O$ 408.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 750 มิลลิลิตร เติม Glacial acetic acid จนได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอน้ำเป็นเวลา 20 นาทีที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ตัวอย่างกราฟผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 3′ จากการทำ 3′RACE



ตัวอย่างกราฟผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5′ จากการทำ 5′ RACE