ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารละลาย

1. Immunomagnetic beads

ดูด immunomagnetic beads ที่ coat ด้วย sheep anti rabbit IgG สำหรับแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 15 ไมโครลิตร รวมในหลอดเดียวกัน แล้ววางใน magnetic concentrator 1 นาที จากนั้นดูดน้ำออก แล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งใช้ PBS 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางใน magnetic concentrator 1 นาที เพื่อดูดน้ำออก เมื่อล้างเสร็จแล้ว เติม PBS สำหรับแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอทำการทดลองต่อไป

2. Lysis buffer

ผสมสารละลาย Tris HCl 10 มมิลลิลิตร 1 M EDTA 50 มิลลิลิตร และ NaCl 1.16 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3. 1 % PFGE agarose gel

ชั่งผง PFGE agarose gel 1 กรัม ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 xTBE 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย จากนั้นนำมาเทใส่ถาดเตรียมเจล แล้ววางไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำไปใช้ต่อไป

4. Phenol:Chloroform

ผสม melted phenol และ chloroform ปริมาตรเท่าๆกัน แล้วเติม 0.1 M Tris HCl pH 7.6 เขย่าแรงๆให้ผสมกัน ปล่อยให้แยกชั้น ดูดชั้นนอกทิ้งไป สกัดซ้ำด้วย 0.1 M Tris HCl pH 7.6 อีก 2-3 ครั้ง เติม 0.1 M Tris HCl ให้ท่วมผิวสารละลาย เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

5. Phosphate buffer solution (PBS) สำหรับการแยกเชื้อโดยวิธี immunomagnetic technique

0.15 M NaCl

0.01 M Sodium phosphate buffer (pH 7.4)

Tween 20 0.05 %

ส่วนประกอบต่อลิตร

$NaH_2PO_4.2H_2O$	0.2963	กรัม
หรือ $NaH_2PO_4.H_2O$	0.2622	กรัม
$Na_2HPO_4.2\ H_2O$	1.424	กรัม
Sodium chloride	8.75	กรัม
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

6. Phosphate buffer solution สำหรับการทำ AP-PCR

ส่วนประกอบต่อลิตร

$Na_2PO_4H_2O$	0.16	กรัม
$NaHPO_4.12H_2O$	1.98	กรัม
NaCl	8.10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ชั่งสารตามส่วนประกอบ ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

7. 3M Sodium acetate

ละลาย sodium acetate.trihydrous 408.1 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pHให้ได้ 5.2 ด้วย glacial acetic จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

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

ชั่ง Tris base 108 กรัม และ boric acid 55 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ต้มพอละลาย อย่าให้เดือด เติม 0.5 M EDTA pH 8.0 จำนวน 40 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำไปใช้ให้เจือจางในระดับความเข้มข้น 1:10 (TBE) และ 1:20 (0.5xTBE)

9. Tris EDTA (TE)

ผสมสารละลาย 10 mM Tris-HCl และสารละลาย 1 mM EDTA โดยการละลาย Tris-HCl จำนวน 1.211 กรัมในน้ำกลั่น และเติมสารละลาย 0.5 M EDTA 1 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

การเตรียมเอนไซม์

10. Lysis solution (1 mg/ml)

ละลายผง lysozyme 0.01 กรัม ในสารละลายที่มี 0.4% N-sodium lauryl sarcosine 0.2% sodiumdeoxycholate 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 และ 50 mM sodium chloride 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

11. เอนไซม์ Proteinase K (0.5 mg/ml)

ละลายผง Proteinase K ในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 10 mM sodium chloride ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 mg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

12. เอนไซม์ RNase (10 mg/ml)

ชั่งเอนไซม์ RNase 100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 15 mM sodium chloride ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส