เอกสารอ้างอิง

Cavanaugh, C.M., Gardiner, S.L., Jones, M.L., Jannasch, H.W. and Waterbury, J.B. 1981. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm, *Rittia pachyptila* : possible chemoautotrophic symbionts. Science 213: 340-342.

Cherest, H.P., Karjan, P. and Surdin-Kerjan, Y. 1987. The *Saccharomyces cerevisiae MET 3* gene : nucleotide seguence and relationship ot the 5′ non coding region to that at *MET 25* Mol. Gen. Genet. 210: 307-313.

Hoffman, M.R., Fausy, B.C., Panda, K.D., Koo, H.H., and Tsachiya, H.M.1981. Kinetics of the removal of iron pyrite from the micorbial catalysis. Appl. Environ. Micorbiol. 42: 259-271.

Kargi, F. and Robinson, J.M. 1982 Removal ot sulfur compounds from coal by the thermophilic organism *Sultolobus acidocaldarium*. Appl. Environ. Microbiol. 44: 878-883.

Kido,C.I. and Liu,S.T.1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. J. Bacteriol. 145: 1365-1373

Laue, B.E. and Nelson, D.C. 1994. Characterization of the gene encoding the autotrophic ATP sulfurylase from the bacterial endosymbiont at the hydrothernal vent tube worm *Riftia pachyptila*. J. Bacteriol. 176: 3723-3729.

Layh, T.S., Taylor, J.C. and Markham, G.D. 1988. The sulfate activation locus of *Escherichia coli* K12 : cloning genetic and enzymatic characterization. J. Biol. Chem. 263: 2409-2416.

Madguvkar, A.M. 1989. Microbiological desulfurization of coal and coal water admixture to provide a desulfurized fuel. Patent. 4,861,723. USA.

Peck, J.H.D. 1961 Enzymatic basis for assimilatory and dissimilatory sulfate reduction. J. Bacteriol. 82: 933-939.

Rai, C. and Reynier, J.P. 1988. Microbial Desulfurization of coals by organisms of the Genus Psehdomonas. Biotechnology Progress 4:225-230.

Renosto, F., Martin, R.L., Nelson, D.C. and Segel, I. H. 1991. ATP sulfurylase from trophosome tissue ot *Rittia pachyptila* (hydrothermal vent tube worm). Arch. Biochem. Biophys. 290: 66-78.

Schwedock, J. and Long, S.R. 1990. ATP sulfurylase activity of the *nod P* and *nod Q* product ot *Rhizobium meliloti*. Nature (London) 348: 644-647.

Tweedie, J.W. and Segel, I.H. 1971. Adenosin triphosphate sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. II Physical, Kinetic and regulatory propotics. J. Biol. Chem. 246: 2438-2446.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

ส่วนที่ 1

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	4	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	4	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.001	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต	0.001	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.2	กรัม

ส่วนที่ 2

ไพโรท์ (บดขนาดประมาณ 100 μm)	20	กรัม

ละลายองค์ประกอบส่วนที่ 1 ในน้ำกลั่น 1000 มล. นำส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนที่ 1 ลงผสมกับส่วนที่ 2 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าประมาณ 3.8-4.4

ส่วนที่ 3 (สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง)

เจลแลนกัม (gellan gum) 4 กรัม

แช่เจลแลนกัมในน้ำกลั่น 300 มล. เป็นเวลา 20 นาที องค์ประกอบส่วนที่ 1 ละลายในน้ำกลั่นเพียง 700 มล. แยกนึ่งฆ่าเชื้อองค์ประกอบทั้ง 3 ส่วน ที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที ผสมองค์ประกอบทั้งหมดอย่างรวดเร็วก่อนแทลงจานเพาะเชื้อ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรวิเคราะห์ซัลเฟต

ส่วนที่ 1

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.004	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.4	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.4	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.2	กรัม

ส่วนที่ 2

ไพไรต์ (บดขนาดประมาณ 100 μm)	20	กรัม

ละลายองค์ประกอบส่วนที่ 1 ในน้ำกลั่น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่องค์ประกอบทั้งสองส่วนแยกกันที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาผสมกันก่อนใช้ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าประมาณ 3.8-4.4

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

แบคโต-ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
วุ้นผง (สำหรับอาหารแข็ง)	20	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ SOB

แบคโต-ทริปโตน	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์	2.5	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	10	มิลิโมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟต	10	มิลลิโมลาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ NBYE

อาหารสำเร็จรูป Nutrient-Broth	8	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
วุ้นผง (สำหรับอาหารแข็ง)	15	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารนิวเตรียนท์ (Nutrient medium)

สารสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
ผงวุ้นสำหรับอาหารแข็ง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว, 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที)

7. อาหารโอ-เอฟ เบซัล (OF Basal medium)

ทริปโตน	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมฟอสเฟต	0.3	กรัม
ผงวุ้น	2.0-3.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู	0.03-0.80	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว, 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที)

8. อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol red broth base)

โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ฟีนอล เรด	0.018	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	7.4	

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว, 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที) น้ำตาลที่ใช้ ได้แก่ กลูโคส (10 กรัม/อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส 1 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

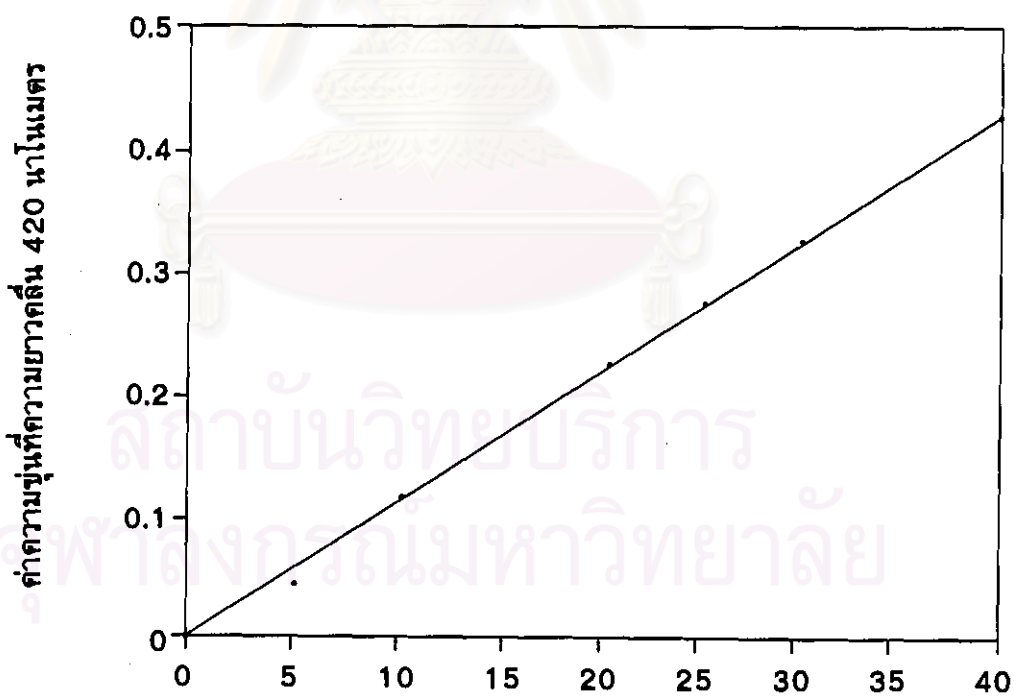
1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต

1.1 สารละลายแบเรียมคลอไรด์เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ละลายแบเรียมคลอไรด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล.

1.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมซัลเฟต

ละลายโซเดียมซัลเฟต 0.1479 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มล. จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของกำมะถันซัลเฟต 0.100 มิลลิกรัม/มล. ทำการเจือจางโดยผสมสารละลายมาตรฐานปริมาณ 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0 และ 40.0 มล. ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล. จะได้สารละลายกำมะถันซัลเฟตมาตรฐานเข้มข้น 0-40 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm)



รูป 18 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกำมะถันซัลเฟตและค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

2. สารละลายบัฟเฟอร์ E

ทริส-เบส ความเข้มข้นสุดท้าย	40	มิลลิโมลาร์
อีดีทีเอความเข้มข้นสุดท้าย	2	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งสองเข้าด้วยกันแล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นจนได้ค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายเป็น 7.9

3. สารละลายไลซิง (Lysing solution)

สารละลายทริส-เบส ความเข้มข้นสุดท้าย	20	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3	เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ผสมองค์ประกอบทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้ค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายเป็น 12.6 แล้วนำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองรูพรุน 0.45 ไมครอน

4. สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม

นำฟีนอลที่ผ่านการทำให้สมดุล (equilibrate) ด้วยทริส-เบส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 แล้วเติม 8-Hydroxyquinoline ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำมาผสมกับ chloroform และ isoamyl-alcohol ในอัตราส่วน 25:4:1

5. สารละลายบัฟเฟอร์ TE ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0

สารละลายทริส-เบส ความเข้มข้นสุดท้าย	10	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นสุดท้าย	1	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งสองเข้าด้วยกันแล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายเป็น 8.0

6. สารละลาย I

สารละลายกลูโคส ความเข้มข้นสุดท้าย 50มิลลิโมลาร์

สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิโมลาร์

สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

7. สารละลาย II

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล	0.2	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	1.0	มล.
น้ำกลั่น	8.8	มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

8. สารละลาย III

สารละลายโปแตสเซียมอะซิเตดความเข้มข้น 5 โมลาร์	50	มล.
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มล.
น้ำกลั่น	28.5	มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

9. สารละลายบัฟเฟอร์ TAE ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 (ความเข้มข้น 50 เท่า)

ทริส-เบส	202	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

10. สารละลายแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล.

สารละลายแอมพิซิลิน (ในรูปเกลือโซเดียม)	200	ไมโครกรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. แล้วนำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°ซ.

11. สารละลาย RF I

โปแตสเซียมอะซิเตด	0.294	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	1.120	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.198	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์	0.990	กรัม
สารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร)	12.190	มล.

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. สารละลาย RF II

MOPS	0.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.10	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	0.12	กรัม
สารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร)	12.190	มล.

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

13. สีติดตาม (tracking dye)

กลีเซอรอล	10	มล.
2-เมอแคปโตเอทานอล	5	มล.
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	10	มล.
สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	12.5	มล.

บรอมฟีนอลบลูเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	0.1	มล.
น้ำกลั่น	12.5	มล.

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

14. สารละลาย TBS (ความเข้มข้น 10 เท่า)

ทริส-เบส	60.58	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	87.66	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้ง 2 ชนิด ในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.5 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

15. สารละลาย SSC (ความเข้มข้น 20 เท่า)

โซเดียมคลอไรด์	175.32	กรัม
ไตรโซเดียมซิเตรต	88.23	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้ง 2 ชนิด ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

16. สารละลาย Prehybridization/Hybridization

สารละลาย SSC (ความเข้มข้น 10 เท่า)	25	มล.
ฟอร์มามีด (formamide)	25	มล.
Rad-Free Blocking Powder	2.5	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.5	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด บ่มและกวนที่อุณหภูมิ 40-60°ซ. เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งองค์ประกอบทั้งหมดละลายหมด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18°ซ. แต่โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตจะตกตะกอน ทำให้ละลายใหม่ โดยการอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ. ก่อนนำไปใช้เพื่อให้แน่ใจว่าส่วนผสมเข้ากันดี และสารละลาย Hybridization ที่มีตัวติดตามต้องทำการกรองด้วยกระดาษกรองชนิด cellulose acetate ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอนที่มี glass fiber prefilter วางซ้อนอยู่ด้านบนก่อนใช้

17. สารละลาย Wash Solution I

สารละลาย SSC ความเข้มข้น 20 เท่า	100	มล.
น้ำกลั่น	890	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	10	มล.

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเรียงตามลำดับเพื่อป้องกันการเกิดตะกอนของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และเตรียมทันทีก่อนนำไปใช้

18. สารละลาย Wash Solution II

สารละลาย SSC ความเข้มข้น 20 เท่า	5	มล.
น้ำกลั่น	98.5	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	10	มล.

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันตามลำดับ เพื่อป้องกันการตกตะกอนของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และเตรียมทันทีก่อนนำไปใช้

19. สารละลาย Blocking solution

สารละลาย TBS ความเข้มข้น 10 เท่า	25	มล.
น้ำกลั่น	225.5	มล.
Rad- Free Blocking Powder	2.5	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	2.5	มล.

ละลาย Blocking Powder ในสารละลาย TBS และน้ำกลั่น กวนที่อุณหภูมิ 40-60°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4°ซ. ได้นาน 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้จึงเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

20. สารละลาย Wash solution III

สารละลาย TBS ความเข้มข้น 10 เท่า	200	มล.

น้ำกลั่น	1780	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	20	มล.

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเรียงตามลำดับก่อนหลังเพื่อป้องกันการตกตะกอนของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

21. สารละลาย Lysis/denature/transfer

โซเดียมคลอไรด์	87.7	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

22. สารละลาย Neutralization

ทริส-เบส	121.14	กรัม

ละลายทริส-เบสในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

23. สารละลาย Fixation/salt

ทริส-เบส	12.14	กรัม
สารละลาย SSC เข้มข้น 20 เท่า	100	มล.

ผสมส่วนผสมทั้งสองชนิดให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

24. สารละลาย TBE (เข้มข้น 10 เท่า)

ละลายทริสเบส 108 กรัม กรดบอริก 55 กรัม และ Na_2EDTA 8.3 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

25. สารละลายอะคริลาไมด์ (เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์)

ละลายอะคริลาไมด์ 38 กรัม บิส-อะคริลาไมด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

26. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 1 กรัมในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

27. สารละลายอะคริลาไมด์ (เข้มข้น 6 เปอร์เซนต์) เพื่อการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาดยาว 1-500 เบส

ละลายยูเรีย 40 กรัม mix-bed ion-exchange resin 2 กรัม ในสารละลายอะคริลาไมด์เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์ จำนวน 12 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40-50 องศาเซลเซียส กรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE เข้มข้น 10 เท่า ที่กรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน จำนวน 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 80 มิลลิลิตร นำไปกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่องปั๊มสูญญากาศ

เติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม TEMED จำนวน 45 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

28. สารละลาย loading sample

สารละลายที่ 1 :

ผสมฟอร์มามิด (deionized formamide) 5 ไมโครลิตร กับสารละลาย EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 จำนวน 1 ไมโครลิตร

สารละลายที่ 2 :

ละลาย Blue dextran 0.3 กรัม ในสารละลาย EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 จำนวน 10 มล.

ผสมสารละลายที่ 1 5 ไมโครลิตรกับสารละลายที่ 2 1 ไมโครลิตร

29. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide solution) ความเข้มข้นสุดท้าย 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

ละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 30% (ปริมาตร/ปริมาตร) 10.0 มล. ในน้ำกลั่น 90.0 มล.

30. สารละลายพารา-อะมิโนไดเมทธิลอะนิลิน ออกซาเลท (p-aminodimethylamiline oxalate)

ละลายพารา-อะมิโนไดเมทธิลอะนิลิน ออกซาเลท 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.
สารละลายต้องเตรียมใหม่ทุก ๆ สัปดาห์

31. สารละลายคริสตอลไวโอเลต (Crystal violet solution)

ละลายคริสตอลไวโอเลต 4.0 กรัม ในน้ำกลั่น 400.0 มล.

32. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	10.0	กรัม
โปแทสเซียมไดไอโอไดด์	0.5	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มล.

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่นช้า ๆ แล้วจึงเติมไอโอดีนคริสตอลลงไป และเติมโปแทสเซียมไอโอไดด์เป็นลำดับสุดท้าย

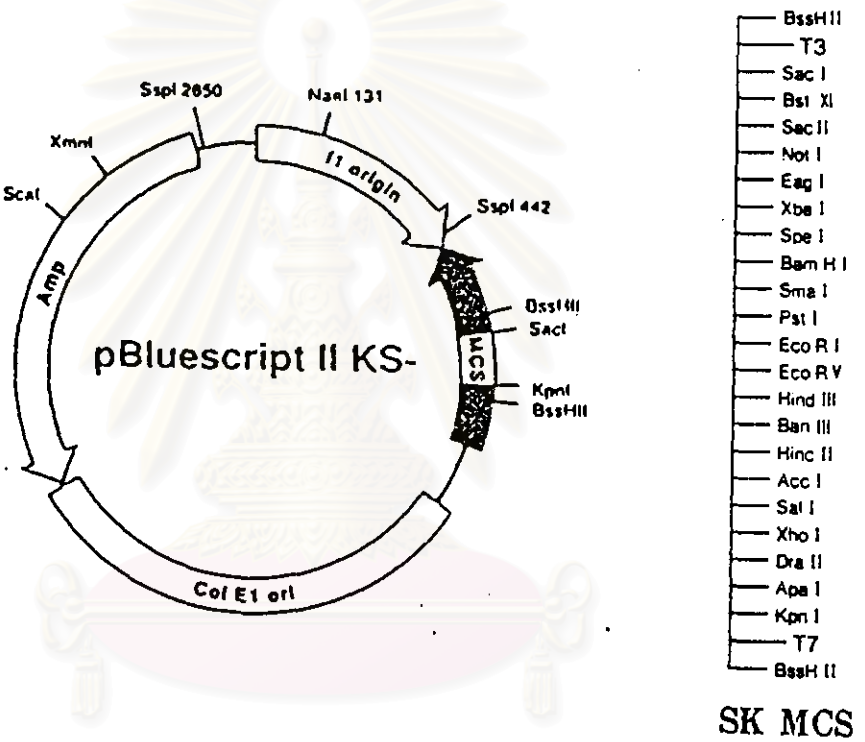
33. สารละลายซาฟรานิน (Safranin staning solution)

ละลายซาฟรานิน 4.0 กรัม ในน้ำกลั่น 200.0 มล.

34. สารละลายมาลาไคท์กรีน (Malachite green solution)

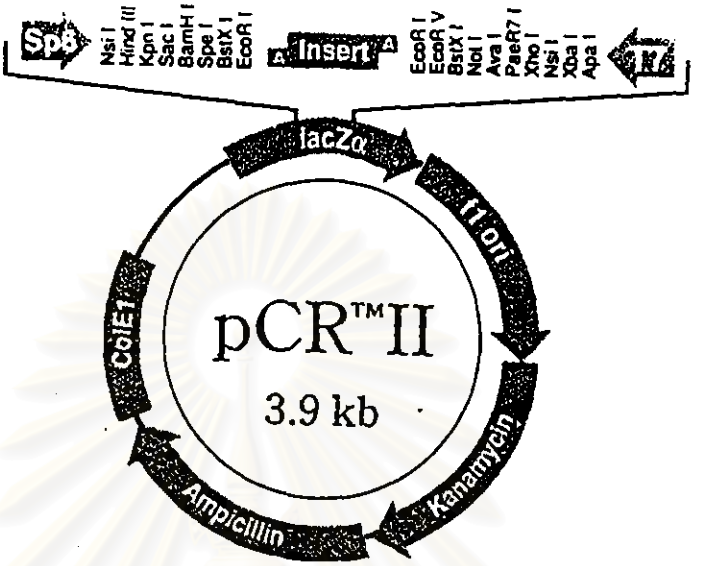
ละลายมาลาไคท์กรีน 5.0 กรัม ในน้ำกลั่น 95.0 มล.

ภาคผนวก ค



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 แผนที่เรสตริกชั่นของพลาสมิดพาหะ pBluescriptSK



รูปที่ 20 แผนที่เรสตริกชั่นของพลาสมิดพาหะ pCR™II

รูปที่ 21 ภาพ TA cloning

ประวัติผู้เขียน

นางสาวศิรพรรณ สุคนธสิงห์ เกิดเมื่อวันที่ 29 ธันวาคม พ.ศ. 2514 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในหลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรมในปีการศึกษา 2536

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย