

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. Luria-Bertani broth (LB broth)

Bacto-Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Luria-Bertani broth (LB) + 50µg/ml Ampicillin

Agar	3.5	กรัม
LB Broth	100	มิลลิลิตร

นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิขาลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม 50µg/ml Ampicillin (0.1g/ml) และเทใส่ในจานเลี้ยงเชื้อประมาณจานละ 10 มิลลิลิตร

3. Ampicillin (0.1g/ml)

Ampicillin	0.1	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว	1	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. 0.5M EDTA (pH 8.0)

EDTA	18.6	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าพีเอชของสารละลายให้เป็น 8 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. 5X TBE buffer (pH 8.0)

Tris base	60.5	กรัม
-----------	------	------

Boric acid	25.6	กรัม
0.5M EDTA	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับค่าพีเอชของสารละลายให้เป็น 8 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปบ่มนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. X-gal (50mg/ml)

X-gal	0.5	กรัม
<i>N,N</i> -dimethylformamide	1	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

7. 0.1M IPTG

IPTG	0.072	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว	3	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

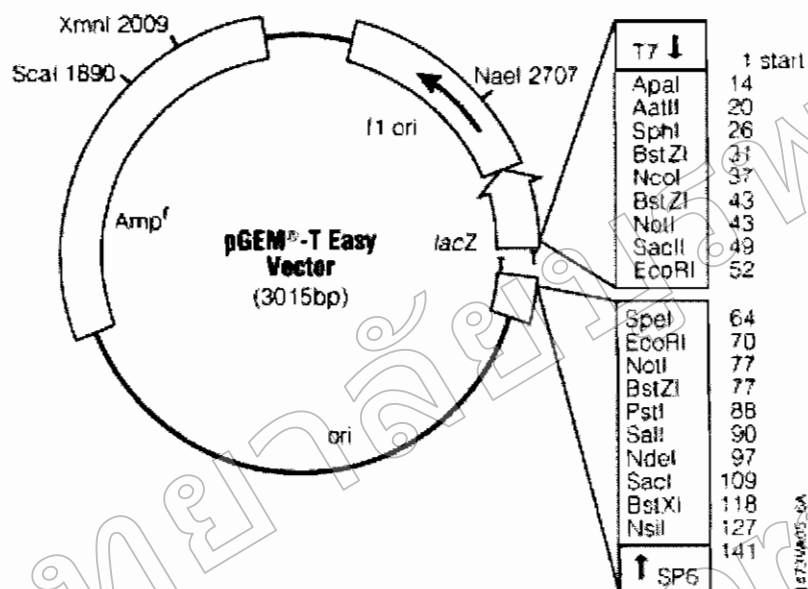
7. Ethidium bromide (1 µg/ml)

Ethidium bromide	10	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

ภาคผนวก ข

แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pGEM-T easy vector

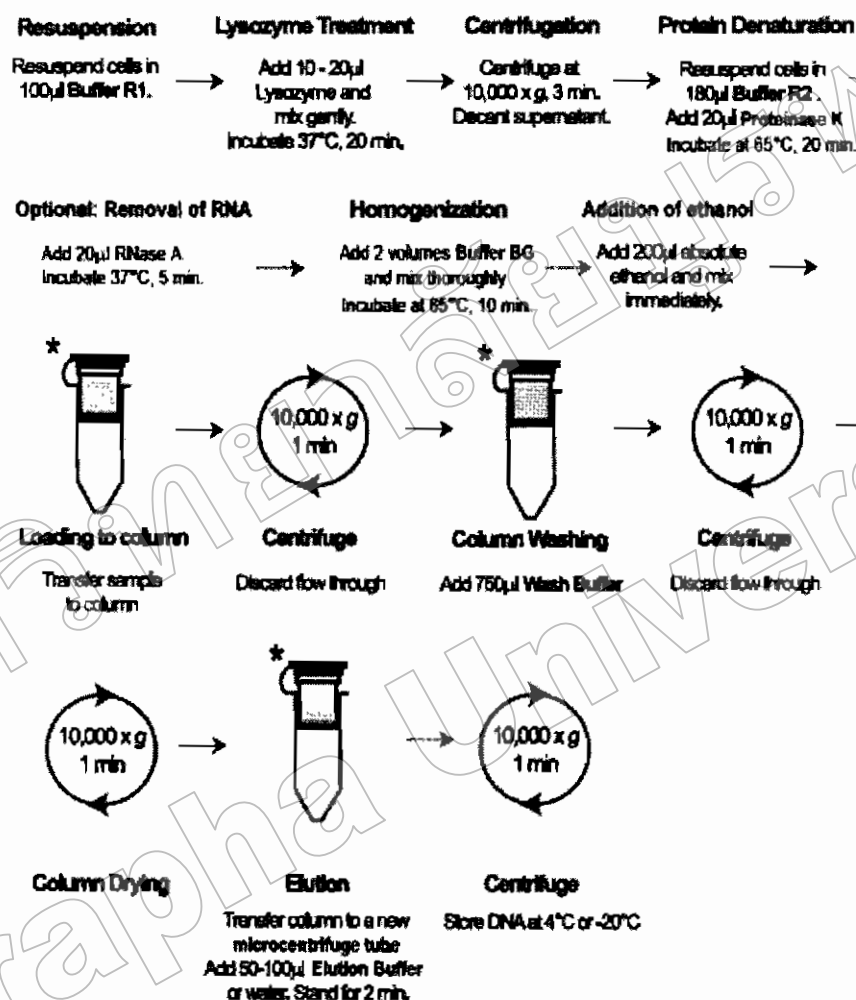
แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pGEM-T easy vector



(ที่มา: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย โดยชุดสกัด

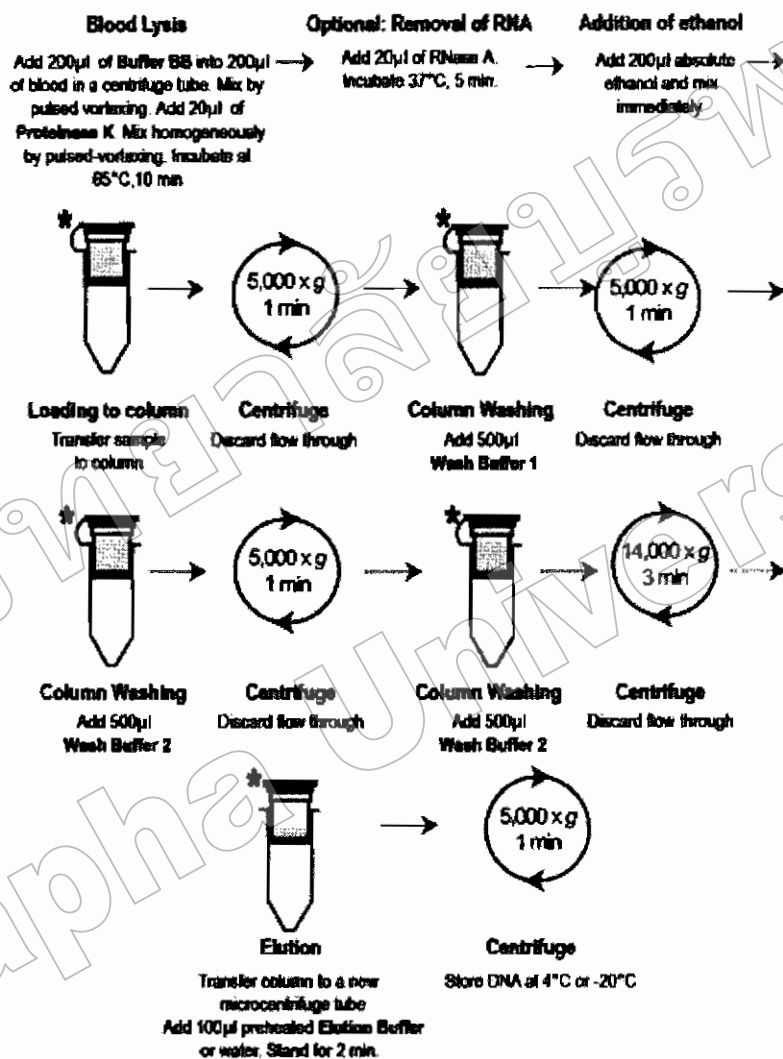
GF-1 Bacterial Extraction kit (Vivantis)



(ที่มา: www.vivantis.com/doc/1112006164042.pdf)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด โดยชุดสกัด

GF-1 Blood DNA Extraction kit (Vivantis)



Contact : info@vivantis.com

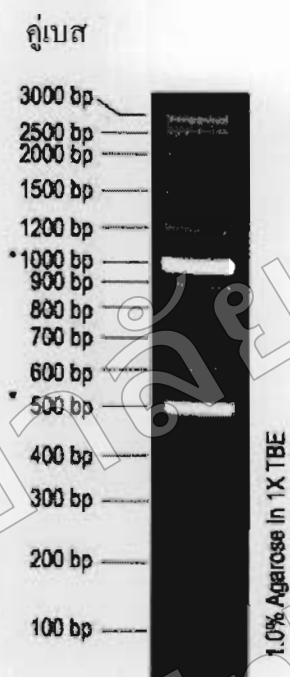
Technical support : tech@vivantis.com

(ที่มา: www.vivantis.com/doc/225200716118.pdf)

ภาคผนวก ก

แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

แถบคี่เอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder



(ที่มา: <http://mymall.netbuilder.com.my/pic/vivantis/363.jpg>)

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ง
วิธีการคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

วิธีการคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ที่ความเข้มข้นแสง 260 นาโนเมตร

ค่า OD = 1 มีความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

ดังนั้นถ้าค่าตัวอย่างดีเอ็นเอ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรเท่ากับ 0.024

จะมีค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอ เท่ากับ $50 \times 0.024 \times 100$ (จำนวนเท่าของการละลาย)

เพราะฉะนั้นดีเอ็นเอของตัวอย่างมีความเข้มข้นเท่ากับ 120 นาโนกรัมต่อมิลลิตร

ภาคผนวก จ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากยีน *16S rRNA* ของ *S. agalactiae*

AGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTAGAA
CGCTGATGTTTGGTGTTTACACTAGACTGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGT
AGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATA
AGAGTAATTAACACATGTTGGT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *S. agalactiae* สายพันธุ์ A909 (Accession no. CP000114.1)

AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTAGAA
CGCTGATGTTTGGTGTTTACACTAGACTGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGT
AGGTAACCTGCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATA
AGAGTAATTAACACATGTTAGT