ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

งานแบคทีเรีย

LB medium 1L

Bacto tryptone	10	g
Bacto yeast extract	5	g
NaCl	10	g
Agar	15	g
Distill water	1,000	ml

ทำการฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave

การเก็บเชื้อใน 25 % glycerol

LB+50% glycerol+ 50 µg/ml kanamycin	1	ส่วน
เชื้อ (Broth)	1	ส่วน

ทำการผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่ -80^{0}C

MgCl2-CaCl2 Solution (การเตรียม competent cell)

80 mM $MgCl_2$+20 mM $CaCl_2$

1M $MgCl_2$	4	ml
1M $CaCl_2$	1	ml
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	45	ml

Stock 1M MgCl2:

$MgCl_2.6H_2O$	203.3	g
Distill water adjust to	1,000	ml

ผสมให้เข้ากันแล้วกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 µm

Stock 1M $CaCl_2$

$CaCl_2$	110.98	g
Distill water adjust to	1,000	ml

ผสมให้เข้ากันแล้วกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 µm

งาน DNA

1% Agarose gel

Agarose	1	g
1xTAE buffer	100	ml

ให้ความร้อนจนละลายโดยใช้ Stirrer heater

50X TAE buffer 1 L

Tris base	242	g
Glacial acetic acid	57.1	ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	100	ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1ลิตร (ไม่ต้อง Sterile)

10X loading dye

Glycerol	20	ml
Bromophenol blue	0.01	g

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วย TE buffer

1 kb DNA marker

Distill water	40	µl
DNA marker	10	µl
10X Loading dye	10	µl

5mg/ml Ethidium bromide

Ethidium bromide	500	mg
Distilled water	100	ml

งานโปรตีน

10X Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	32	g
KCl	0.8	g
Na_2PO_4	6	g
KH_2PO_4	0.8	g
Distilled water	400	ml

Lysis buffers Denaturing condition1 liter:pH 8.0

NaH_2PO_4	13.8	g
Tris·Cl	1.2	g
Urea	480.5	g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 1000 ml

Adjust pH to 8.0 using NaOH.

Wash buffer Denaturing condition1 liter: pH 6.3

NaH_2PO_4	13.8	g
Tris·Cl	1.2	g
Urea	480.5	g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 1000 ml

Adjust pH to 6.3 using HCl.

Elution buffers Denaturing condition1 liter:pH 4.5

NaH_2PO_4	13.8	g
Tris·Cl	1.2	g
Urea	480.5	g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึง 1000 ml

Adjust pH to 4.5 using HCl

Polyacrylamide gel

Chemicals	4.5%gel	10%gel	15%gel
น้ำกลั่น sterile	1.8 ml	3.2ml	1.5ml
1.5MTris-HCl pH 8.8	-	3.3ml	3.3ml
10% SDS	20 µl	133 µl	133 µl
30%Acrylamide	450 µl	3.3ml	5.0ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	750 µl	-	-
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
Total volume	3,075 µl*	9,980 µl**	9,980 µl**

* เทได้ 1 gel

** เทได้ 2 gel

0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris base (MW 121.1)	60.55	g
Distill water	1000	ml

ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 6.8

1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (300 ml)

Tris base (MW 121.1)	54.5	g
Distill water ประมาณ	250	ml

ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 8.8

Transfer buffer 1 L

Tris base	3	g
Glycine	14.4	g
Methanol	200	ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

30% Acrylamide

Acrylamide	29	g
Bis	1	g
DW	100	ml

2X Sample buffer (5 ml)

น้ำกลั่น	3	ml
SDS	0.1	g
1.5M Tris-HCl pH 8.8	0.25	ml
Bromophenol blue	0.005	g
Glycerol	1.7	ml

Buffer Tris-Glycine 1000 ml

Tris-base (Tris-Hydroxy methyl aminomethane)	3	g
Glycine	14	g
SDS	1	g
Distilled water	1,000	ml

Coomassie brilliant blue (R) staining 100 ml

Coomassie brilliant blue (R)	0.25	g
Methanol	45	ml
Distilled water	45	ml
Glacial acetic acid	10	ml

Destaining 100 ml

Methanol	45	ml
Distilled water	45	ml
Glacial acetic acid	10	ml

5% skim milk (for blocking)

Skim milk	0.1	g
1X PBS	2	ml

2% skim milk (for dilute antibody)

5%skim milk	1	ml
1X PBS	3	ml

Primary antibody (Mouse Anti-His IgG) 1:1000

Mouse Anti-His IgG	1	µl
2% skim milk	1000	µl

Primary antibody (Mouse Anti-IL-13 IgG) 1:1000

Mouse Anti-IL-13 IgG	1	µl
2% skim milk	1000	µl

Secondary antibody (Anti-mouseIgG) 1:1000

Secondary antibody	1	µl
2% skim milk	1000	µl

Peroxidase substrate

PBS	1	ml
3% H_2O_2	5	µl
DAB	0.002/<	g

Cell culture

Eagle's minimum essential medium (MEM) complete media

MEM	90	ml
Heat inactivated Fetal bovine serum	10	ml
Penicillin-Streptomycin	1	ml

10X PBS for cell culture

NaCl	32	g
KCl	0.8	g
Na_2PO_4	6	g
KH_2PO_4	0.8	g
18.0 mΩ	400	ml

0.25 % trypsinEDTA

5% trypsin EDTA (0.5% 10X)	10	ml
1X PBS	190	ml

Frozen media

Complete media	9	ml
DMSO	1	ml

5 mg/ml MTT

MTT	5	mg
PBS	1	ml

ละลายให้เข้ากันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 µm เก็บไว้ที่ 2-8 0C

MTT solution

5 mg/ml MTT	2	ml
Media	8	ml