ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ของม ธรรณี

ภาคผนวกก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Campylobacter Enrichment Broth Base แบบสำเร็จ

ชั่ง Preston 12.5 กรัม ลงในฟลาสก์ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 470 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brucella Sheep Blood Agar (BSA)

Tryptone	10 กรัม
Peptone	10 กรัม

Glucose	10 กรัม
Yeast extract	10 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Sodium hydrogen sulfide	0.1 กรัม
Agar	15 กรัม
Campylobacter Selective Supplement-IV	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
pH	7

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน (ยกเว้น Campylobacter Selective Supplement-IV) นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ รอให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 50-60 องศาเซลเซียส จึงเติม Campylobacter Selective Supplement-IV

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้า นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Agar

Peptone	1 กรัม
Dextrose	1 กรัม
Sodium choride	5 กรัม
Monopotassium phosphate	2 กรัม
Urea	20 กรัม
Phenol red	0.012 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร
pH	6.8

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน (ยกเว้น Urea ให้ละลายน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร) นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลง 50-60 องศาเซลเซียส จึงเติม Urea ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยผ่านกระดาษกรอง

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate broth

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Potassium nitrate	1 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. Nitrate reagent A

Sulfanilic acid	0.8 กรัม
Acetic acid 5 N	100 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Nitrate reagent B

Alpha-naphthylamine	0.5 กรัม
Acetic acid 5 N	100 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Ninhydrin

Ninhydrin	0.07 กรัม
Acetone	1 มิลลิลิตร
Butanol	1 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : ควรทำใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน

4. 15% Hydrogen peroxide

15% Hydrogen peroxide	37.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดให้เข้า เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

5. 10X TBE Buffer

Tris-HCl	108 กรัม
Boric acid	55 กรัม
0.5 M Na_2EDTA (pH 8)	40 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

นำ Tris-HCl 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม 0.5M Na_2EDTA (pH 8) 40 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. 0.5 M EDTA

EDTA	93.05 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร
pH	8

ละลาย EDTA ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร โดยใช้ Megnetic stirrer ปรับ pH โดยเติม NaOH ให้ได้ pH 8 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

7. 2% Agarose gel

Agarose	2 กรัม
0.5 TBE buffer	100 มิลลิลิตร
Redsaft	5 ไมโครลิตร

Melt ด้วย microwave (รอให้อุณหภูมิลดลง แล้วเติม Redsaft100 มิลลิลิตร ใช้ Redsafe 5 ไมโครลิตร

8. dNTP 10 µM

dATP	20 ไมโครลิตร
dCTP	20 ไมโครลิตร
dGTP	20 ไมโครลิตร
dTTP	20 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	120 ไมโครลิตร

การเตรียมStock dNTPsที่ใช้ในเทคนิคPCR และ LAMP โดยนำส่วนประกอบข้างต้นผสมรวมกัน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

9. สี HNB

HNB	0.62 กรัม
น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. DNA Maker 100 bp

DNA	60ไมโครลิตร
Loading dry	20ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	20 ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบของสารเข้าด้วยกัน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี