ภาคผนวก

การทดลองที่ 1 สัณฐานวิทยา

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าตัวเลขการพิจารณา Descriptor list ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะที่ \ ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	2	1	1	0	3	3	3
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2
11	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
23	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	0	0	0
24	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	2	3	3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 กายวิภาคศาสตร์

1. น้ำยาฆ่าและรักษาสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing solution) คือน้ำยา FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ผสมสารเคมีในอัตราส่วนดังต่อไปนี้

ethyl alcohol 95%	50.00	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5.00	มิลลิลิตร
formalin	10.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35.00	มิลลิลิตร

2. น้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ซึ่งมีส่วนผสมของ ethyl alcohol 95%, absolute alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่นในอัตราส่วนต่างกัน ตั้งแต่ระดับ 50% ของน้ำยาไปจนถึง 100% ของน้ำยา ดังแสดงส่วนผสม และอัตราส่วนของสารเคมีดังตารางภาคผนวกที่ 2

ตารางภาคผนวกที่ 2 ส่วนผสม และอัตราส่วนของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์

สารเคมี (มิลลิลิตร)	อัตราส่วน				
	50%	70%	85%	95%	100%
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-
ethyl alcohol 95%	40	50	50	45	-
TBA	10	20	35	55	75*
absolute alcohol	-	-	-	-	25

* ผสมสี erythrosin

3. น้ำยายึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นสไลด์ (adhesive) ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

ตีไข่ขาวจนข้นตักฟองออกจนหมด ผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:49 กรองด้วยสำลี แล้วเก็บเป็น Stock ที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้ให้ผสม Stock กับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:50 แล้วกรอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สีสังเคราะห์สำหรับย้อมเนื้อเยื่อ คือ Dalafield's hematoxylin ส่วนประกอบ และวิธีการเตรียม คือ

ammonium aluminium sulfate	400.00	มิลลิลิตร
hematoxylin	4.00	กรัม
ethyl alcohol 95%	25.00	มิลลิลิตร
methyl alcohol	100.00	มิลลิลิตร
glycerol	100.00	มิลลิลิตร

ละลาย ammonium aluminium sulfate ในน้ำกลั่นจนอิ่มตัว ผสมกับ hematoxylin ที่ละลายใน ethyl alcohol 95% นำไปตากแดด 3-4 วัน นำมากรอง แล้วเติม methyl alcohol และ glycerol คนให้เข้ากันใส่ในขวดสีชาทิ้งไว้ 2-3 เดือน เก็บเป็น Stock ก่อนใช้จึงนำมากรอง

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าตัวเลขการพิจารณา Descriptor list ด้วยลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์

ตัวอย่าง / ลักษณะที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 เซลล์วิทยา

สีย้อมโครโมโซม carbon fuchsin ประกอบด้วยสารเคมี และการเตรียม ดังต่อไปนี้

Stock A

basic fuchsin	3.00	กรัม
ethanol 70%	100.00	มิลลิลิตร

ละลาย basic fuchsin ลงใน ethanol 70% เก็บใส่ขวดสีชาใส่ตู้เย็นไว้

Stock B

phenol 5%	5.025	กรัม

ตวง Stock A 10 มิลลิลิตร ผสม phenol 5% แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

Stock C

glacial acetic acid	6.00	มิลลิลิตร
formaldehyde 37%	6.00	มิลลิลิตร

ตวง Stock B 55 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid และ formaldehyde 37%

acetic acid 45%	95.00	มิลลิลิตร
sorbitol	1.80	กรัม

ตวง Stock C 5-10 มิลลิลิตร เติม acetic acid 45% และ sorbitol เก็บไว้ในตู้เย็น

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าตัวเลขการพิจารณา Descriptor list ด้วยลักษณะทางเซลล์วิทยา

ลักษณะที่ \ ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
5	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
7	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
8	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 แบบแผนของ allozyme

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม extraction buffer

Tris-HCl 0.05 M pH 8.4	100.00	มิลลิลิตร
NaCl 150 mM	1.7532	กรัม
cysteine 10 mM	0.1212	กรัม
ascorbic acid 1 mM	0.0352	กรัม
$CaCl_2$ 1 mM	0.0294	กรัม
Na_2-EDTA 1 mM	0.7444	กรัม
nicotine 2%	2.00	มิลลิลิตร

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Tris-HCl buffer 0.05 M pH 8.4

Tris	1.1057	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.4 ด้วย 1N NaOH หรือ 1 N HCl

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม electrode buffer

Tris	6.00	กรัม
glycine	28.80	กรัม

เตรียมสารละลายโดยการละลาย Tris 6.0 กรัม และ glycine 28.8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.3 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1N HCl เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้ให้เติมน้ำกลั่นไปอีก 10 เท่าจะได้ pH ประมาณ 8.3 โดยไม่จำเป็นต้องปรับ pH

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม marker dye solution

bromophenol blue	0.05	กรัม
glycerol	1.00	มิลลิลิตร
Tris-HCl buffer pH 6.7	10.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. สารที่ใช้เตรียม Tris-HCl buffer pH 6.7 (สำหรับเตรียม marker dye solution)

HCl 1N	48.00	มิลลิลิตร
Tris	5.98	กรัม
TEMED	0.46	มิลลิลิตร

6. การเตรียมเจล

Stock A : polyacrylamide gel 30%

acrylamide	28.00	กรัม
N, N-methylene bisacrylamide gel	0.74	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรอง และเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

Stock B : Tris-HCl buffer pH 8.9 ประกอบด้วย

HCl 1 N	4.80	มิลลิลิตร
Tris	36.60	กรัม
TEMED	0.23	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรอง และเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

Stock C : 0.1% ammonium persulfate

ammonium persulfate	0.10	กรัม
น้ำกลั่น	1.00	มิลลิลิตร

อัตราส่วนในการเตรียม running gel (8.5% acrylamide gel)

Stock A	20.00	มิลลิลิตร
Stock B	8.25	มิลลิลิตร
Stock C	825.00	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	37.71	มิลลิลิตร
TEMED	115.50	ไมโครลิตร

7. การเตรียม acetaer buffer 0.5 M pH 4.8

การเตรียม stock solution

A: 0.5 M solution of acetic acid (28.875 ml. In 1,000)

B: 0.5 M solution of sodium acetate (68 g. of $C_2H_2O_2Na3H_2O$ in 1,000 ml.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้สารละลาย A 20.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 30. มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นพร้อมกับปรับ pH ให้ได้ 4.8 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

8.1 peroxidase (PER)

สารเคมี

1.	stock A : 3 amino-9 ethylcarbazole	0.42	กรัม
	β-napthol	0.29	กรัม
	acetone	200.00	มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

2.	stock B : Tris buffer 0.1 M pH 4.0		
	Tris-hydroxymethyl aminomethane	3.78	กรัม
	acetic acid	4.05	มิลลิลิตร

ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ให้ได้ 4.0 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ปริมาตร 2.5 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

3.	stock C : H_2O_2 3%		
	เตรียมจาก H_2O_2 30%	10.00	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

วิธีการเตรียม ใช้อัตราส่วน stock A:B:C = 20:80:1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืด เป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที

8.2 acid phosphatase (ACP)

สารเคมี

acetate buffer 0.5 M pH 4.8	100.00	มิลลิลิตร
fast bule-B salt	0.10	กรัม
1% napthyl acid phosphate (monosodium salt)	0.10	กรัม
$MgCl_2$ 10%	10.00	หยด

วิธีการเตรียม นำสารในข้อ 1, 2 และ 3 ละลายให้เข้ากันดี แล้วกรองในที่มืด ก่อนย้อมสีเติมข้อ 4 ลงไป แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที

8.3 esterase (EST)

สารเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Tris-HCl 0.1 M pH 7.0	100.00	มิลลิลิตร
α-naphtylacetate	0.04	กรัม
β-naphtylacetate	0.02	กรัม
fast blue-B salt	0.12	กรัม

วิธีการเตรียม นำสารในข้อ 2 และ 3 ละลายใน acetone 500 ไมโครลิตร ให้เข้ากันดี

8.4 malate dehydrogenase (MDH)

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0	100.00	มิลลิลิตร
L-malic acid	0.20	กรัม
NAD 10%	0.04	กรัม
NBT 10%	0.02	กรัม
PMS 10%	0.004	กรัม

9. การเตรียมน้ำยา fix (กรดแอซิติกเข้มข้น 7%)

acetic acid	70.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	930.00	มิลลิลิตร
glycerol	20.00	มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีจากเอนไซม์ acid phosphatase

Rf \ ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0.107	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
0.150	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
0.218	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0.278	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.303	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.554	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.589	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีจากเอนไซม์ esterase

Rf \ ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0.278	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
0.350	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
0.441	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0.621	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0.704	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
0.732	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
0.778	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.803	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคผนวกที่ 7 ค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีจากเอนไซม์ malate dehydrogenase

Rf \ ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0.120	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
0.183	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
0.218	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
0.254	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0.434	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.490	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
0.504	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0.540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0.575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.611	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีจากเอนไซม์ peroxidase

Rf \ ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0.132	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0.150	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.375	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0.715	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

การทดลองที่ 6 กายวิภาคศาสตร์ของเม็ดแป้ง

สารละลายไอโอดีน มีส่วนประกอบ และวิธีการเตรียม คือ

ไอโอดีน	5.00	กรัม
โปตัสเซียมไอโอไดด์	15.00	กรัม

ละลายไอโอดีน และโปตัสเซียมไอโอไดด์ ในน้ำกลั่น เจือจางเป็น 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลายไอโอดีนเข้มข้น 1 N (100%) เก็บ Stock เมื่อจะใช้จึงเจือจาง Stock กับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:50 จะได้สารละลายไอโอดีนเข้มข้น 2% ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอัปสร วิทยประภารัตน์
วัน เดือน ปี เกิด	27 เมษายน 2521
ที่อยู่ที่ติดต่อได้	211 หมู่ที่ 16 ต.หนองเหียง อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี 20140 โทรศัพท์ 0-3829-9062 20/201 หมู่ที่ 5 ต.ห้วยกะปิ อ.เมือง จ.ชลบุรี 20130 โทรศัพท์ 0-3838-6244 E-mail address : iamabsorn@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพนัสพิทยาคาร จ.ชลบุรี ปีการศึกษา 2539 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ ปีการศึกษา 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved