ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

100 mM phosphate buffer pH 7.0

เตรียม KH_2PO_4 + Na_2HPO_4 โดยเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกันก่อน

การเตรียมสารละลาย Na_2HPO_4

เตรียม stock 1 M Na_2HPO_4 (100 มิลลิลิตร)

Na_2HPO_4	14.196	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

จากนั้นนำ 1 M Na_2HPO_4 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 mM Na_2HPO_4 โดยการแบ่ง 1 M Na_2HPO_4 มา 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ 450 มิลลิลิตร จะได้ 100 mM Na_2HPO_4

การเตรียมสารละลาย KH_2PO_4

เตรียม stock 1 M KH_2PO_4 (200 มิลลิลิตร)

KH_2PO_4	27.22	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

จากนั้นนำ 1 M KH_2PO_4 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 mM KH_2PO_4 โดยการแบ่ง 1 M KH_2PO_4 มา 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ 450 มิลลิลิตร จะได้ 100 mM KH_2PO_4

นำ 100 mM Na_2HPO_4 300 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH โดยค่อย ๆ เติม 100 mM KH_2PO_4 จนกว่า pH เท่ากับ 7.0 จะได้ 100 mM phosphate buffer pH 7.0

100 mM borate buffer pH 9.0

เตรียม stock 500 mM borate buffer pH 9.0 (500 มิลลิลิตร)

ชั่ง boric acid 15.46 กรัม ละลายในน้ำด้วยการใช้เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก และชั่ง NaOH 4.5 กรัม ละลายในน้ำแยกกันก่อน แล้วจึงนำไปปรับ pH โดยค่อย ๆ เติมสารละลาย NaOH ลงในสารละลาย boric acid จนกว่า pH เท่ากับ 9.0 จากนั้นปรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จะได้ 500 mM borate buffer pH 9.0 แล้วจึงนำไปเจือจางให้ได้100 mM borate buffer pH 9.0 ก่อนนำไปใช้

20 mM potassium phosphate buffer pH 7.0

เตรียมสารละลาย K_2HPO_4 + KH_2PO_4 โดยเตรียมสารละลายแต่ละตัวแยกกันก่อน

การเตรียมสารละลาย K_2HPO_4

เตรียม stock 500 mM K_2HPO_4 (100 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	8.709	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย KH_2PO_4

เตรียม stock 500 mM KH_2PO_4 (100 มิลลิลิตร)

KH_2PO_4	6.805	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

นำ stock 500 mM K_2HPO_4 มา 50 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH โดยค่อย ๆ เท stock 500 mM KH_2PO_4 ลงไปจนกว่า pH เท่ากับ 7.0 จะได้ stock 500 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 แล้วจึงนำไปเจือจางให้ได้ 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ stock 500 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 มา 4 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 98 มิลลิลิตร จะได้ 20 mM potassium phosphate buffer pH 7.0

1 M NaCl (100 มิลลิลิตร)

NaCl	5.84	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำไปใช้เป็น stock NaCl solution ในการปรับความเข้มข้นของปริมาตรน้ำใสให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 M NaCl ในการตกตะกอนไวรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสีย้อมกริดแบบ negative stains

การเตรียมสีย้อมกริดแบบ negative stains โดยการใช้ 2% phosphotungstic acid pH 7.0 โดยการชั่ง phosphotungstic acid 2 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วย KOH นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนพืช

Extraction buffer สำหรับใช้ในการสกัดโปรตีนพืช

ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl pH 7.0, 1mM EDTA, 2mM DTT, 10mM 2-mercaptoethanol, 0.005% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ 4% SDS (w/v) โดยเตรียม stock solution ของสารละลายแต่ละชนิดก่อน

1 M Tris-HCl pH 7.0 (100 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris-base 12.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

500 mM EDTA (100 มิลลิลิตร)

ชั่ง disodium ethylenediamine tetraacetate·$2H_2O$ (EDTA) 18.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

10 mM DTT (10 มิลลิลิตร)

Dithiothreitol (DTT)	0.0154	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

2-mercaptoethanol (National Diagnostics, U.K.)

จากขวด stock 2-mercaptoethanol มีความเข้มข้นเท่ากับ 14.2 M

0.1% PMSF (10 มิลลิลิตร)

ชั่ง PMSF 0.01 กรัม ละลายใน absolute ethanol 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม Extraction buffer

Stock solution	**final concentration**	**volume**
1 M Tris-HCl pH 7.0	100 mM Tris-HCl pH 7.0	2 มิลลิลิตร
500 mM EDTA	1 mM EDTA	40 ไมโครลิตร
10 mM DTT	2 mM DTT	4 มิลลิลิตร
14.2 M 2-mercaptoethanol	10 mM 2-mercaptoethanol	15 ไมโครลิตร
0.1% PMSF	0.005% PMSF	1 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทุกชนิดเข้าด้วยกัน ชั่ง SDS 0.8 กรัม เติมลงในสารละลาย extraction buffer แล้วปรับปริมาตรด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ครบ 20 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

Sample buffer สำหรับ SDS-PAGE

500 mM Tris-HCl pH 6.8	1.25	มิลลิลิตร
glycerol	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	2.0	มิลลิลิตร
0.5% bromophenol blue	0.2	มิลลิลิตร

เติม 2- mercaptoethanol 50 ไมโครลิตร ลงใน sample buffer 950 ไมโครลิตร ก่อนใช้

10X Running buffer (1 ลิตร)

Tris-base	30.275	กรัม
Glycine	144.192	กรัม
SDS	10.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

Staining solution (100 มิลลิลิตร)

Coomassie brillian blue R-250	0.25	กรัม
Methanol	50	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรองก่อนใช้ และสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

Destaining solution (1 ลิตร)

Methanol	250	มิลลิลิตร
Acetic acid	75	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอวิธี SDS-phenol

Extraction buffer

Phenol	20	มิลลิลิตร
Chloroform	20	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4	มิลลิลิตร

5 M NaCl

ชั่ง NaCl 29.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารละลาย A (100 มิลลิลิตร)

500 mM Tris-HCl pH 7.5	2	มิลลิลิตร
500 mM EDTA	2	มิลลิลิตร
1% SDS	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย DEPC- treated water จนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5 M LiCl (100 มิลลิลิตร)

ชั่ง LiCl 21.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3 M sodium acetate (NaOAc) (100มิลลิลิตร)

ชั่ง NaOAc 40.824 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ด้วย acetic acid จนกว่า pH เท่ากับ 5.2 ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การสกัดอาร์เอ็นเอวิธี CF-11 cellulose

10X STE buffer (1 ลิตร)

Tris base	61	กรัม
NaCl	58	กรัม
EDTA	3.7	กรัม

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl จนกว่า pH เท่ากับ 6.8 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

Extraction buffer

10X STE buffer	20	มิลลิลิตร
SDS	2	กรัม
Polyvinylpyrolidone-40	1	กรัม

ชั่ง SDS 2 กรัม และ Polyvinylpyrolidone-40 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม 10X STE buffer 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

16% Ethanol in STE

1X STE	84	มิลลิลิตร
absolute ethanol	16	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดอาร์เอ็นเอวิธี Guanidine thiocyanate

สารละลาย D (220 มิลลิลิตร)

Guanidine thiocyanate	100	กรัม
0.75 M Sodium citrate tribasic dehydrate pH 7	7.04	มิลลิลิตร
10% N-Lauroylsarcosine (sarcosyl)	10.56	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	117.2	มิลลิลิตร

เติม 2-mercaptoethanol ในอัตรา 0.36 มิลลิลิตร ต่อ สารละลาย D 50 มิลลิลิตร ก่อนใช้ (สามารถเก็บได้นาน 1 เดือน)

2 M Sodium acetate pH 4.1 (100 มิลลิลิตร)

ชั่ง NaOAc 27.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วเติมปรับ pH ด้วย acetic acid จนกว่า pH เท่ากับ 4.1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

หมายเหตุ น้ำกลั่นที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเพื่อการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 3 วิธีต้องเป็น DEPC-treated water ซึ่งเตรียมโดยเติม Diethylpyrocarbonate (DEPC) 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ตลอดจนเครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอต้องนำไปอบที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ส่วนหลอดทดลองนำไปแช่ใน 0.1% DEPC-treated water บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย DEPC-treated water หลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารละลายสำหรับเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

5X TBE buffer (1 ลิตร)

Tris base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
500 mM EDTA pH 8.0	20	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Loading dye

Bromophenol blue	0.25%
Xylene cyanol	0.25%
Glycerol in H_2O	30%

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าใช้จ่ายโดยประมาณในการสกัดอาร์เอ็นเอแต่ละวิธี (ต่อ 1 ตัวอย่าง)

วิธีที่ 1 : SDS-phenol

Phenol	16	บาท
Chloroform	1	บาท
Mercaptoethanol	1	บาท
LiCl	44	บาท
Tris base	2	บาท
EDTA	5	บาท
SDS	10	บาท
NaOAc	4	บาท
รวม	**83**	**บาท**

วิธีที่ 2 : CF-11 cellulose

1X STE buffer	2	บาท
Cellulose	5	บาท
NaOAc	4	บาท
Chloroform	2	บาท
Pentanol	2	บาท
Ethanol	10	บาท
PVP-40	10	บาท
SDS	10	บาท
รวม	**45**	**บาท**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ 3 : Guanidine thiocyanate

Guanidine thiocyanate (Fluka)	1520	บาท
Chloroform	1	บาท
Ethanol	1	บาท
Phenol	8	บาท
Sarcosyl (Sigma)	800	บาท
รวม	**2330**	**บาท**

วิธีที่ 4 : Plant RNA isolation kit ((UltraClean™, MO BIO Laboratories, Inc., USA)

ชุด Kit 20 reaction ราคา	3800	บาท
1 reaction	**190**	**บาท**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุดาพร ปุกแก้ว
วัน เดือน ปีเกิด	7 มิถุนายน พ.ศ. 2522
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนลำปางกัลยาณี จังหวัดลำปาง ปีการศึกษา 2537 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนสุรนารีวิทยา จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2540 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น ปีการศึกษา 2544
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนอุดหนุนบัณฑิตศึกษา โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประสบการณ์	- ได้รับรางวัลนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ดีเด่น การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 10-11 สิงหาคม 2547 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จ.เชียงใหม่ - เข้าร่วมเสนอผลงานภาคบรรยาย งานสัมมนาวิชาการเกษตร ครั้งที่ 2 วันที่ 20 สิงหาคม พ.ศ. 2547 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผลงานวิจัย	งานวิจัยปัญหาพิเศษระดับปริญญาโทเรื่อง “การคัดเลือกแบคทีเรียบนผิวใบเพื่อควบคุมโรคแอนแทคโนสของเสาวรส” ปีการศึกษา 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved