



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

1.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Agar	20	กรัม
Dextrose	15	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง และล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์ ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุกแต่ไม่และจนเกินไป กรองเนื้อมันฝรั่งออก ผสมกับ agar ที่ต้มจนละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม dextrose คนให้ละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.2 Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	15	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง และล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุกไม่และจนเกินไป กรองเนื้อมันฝรั่งออก เติม dextrose คนให้ละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2. สารเคมีจำเป็นสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

2.1 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)

ผสมสารละลาย phenol 25 มิลลิลิตร กับ chloroform 24 มิลลิลิตรและ isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น)

2.2 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)

ผสมสารละลาย chloroform 24 มิลลิลิตรกับ isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น)

2.3 TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	0.1	มิลลิลิตร
1 mM EDTA (pH 8.0)	0.02	มิลลิลิตร
ผสมสารละลายทั้งสองตามปริมาตรเข้าด้วยกัน	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	100
มิลลิลิตร	นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ	เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.4 70% ethanol

ผสมสารละลาย ethanol 70 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.5 ice-cold absolute alcohol

เทสารละลาย absolute alcohol ใส่ขวดเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Goodwin *et al.* (1992)

3.1 Extraction buffer (100 ml)

- 0.5 M EDTA
- 1 M Tris, pH 8
- 3 M NaCl
- 1% β -mercaptoethanol

ชั่งสาร Tris-HCl จำนวน 12.11 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 70 มิลลิลิตร กวนสารด้วย magnetic stirrer ปรับ pH เป็น 8 จากนั้นเติม NaCl 17.52 กรัม และ EDTA 13.61 กรัม กวนให้สารละลายเข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดฆ่าเชื้อ เมื่อจะใช้จึงเติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรสารละลายที่ต้องการใช้

3.2 5 M Potassium acetate (100 ml)

ละลายสาร potassium acetate 49.1 กรัม ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 70 ml กวนด้วย magnetic stirrer ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.3 3 M Sodium acetate (NaOAc) (100 ml)

ละลายสาร sodium acetate 4.08 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง (ปรับ pH ด้วย glacial acetic acid)

4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Roger & Bendich (1998)

4.1 10XCTAB

CTAB

100 mM Tris (pH 8) 50 มิลลิลิตร

20 mM EDTA (pH 8) 20 มิลลิลิตร

1.4 M NaCl 140 มิลลิลิตร

ผสม CTAB 10 กรัม กับ Tris 50 มิลลิลิตร และ EDTA 20 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เติม NaCl 140 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4.2 10%CTAB

CTAB 5 กรัม

5 M NaCl 7 มิลลิลิตร

ชั่งสาร CTAB 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 30 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย 5 M NaCl 7 มิลลิลิตร (จาก stock solution) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ พัชรา (2543)

5.1 Extraction buffer (100 ml)

50 mM Tris-HCl (pH 8)

850 mM NaCl

100 mM EDTA

1% SDS

ผสม Tris-HCl 0.6 กรัม กับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 70 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8 เติม EDTA 3.7 กรัม กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เติม NaCl 0.5 กรัม และ SDS 1 กรัม ละลายสารให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย

6.1 0.5 M NaOH

ชั่งสาร NaOH 1.42 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร

6.2 100 mM Tris-HCl

ชั่งสาร Tris-HCl 1.58 ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับ pH เป็น 8 และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

7. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Akira masunaka

7.1 Extraction buffer

1 M Tris (pH 8)	0.5	มิลลิลิตร
0.2 M EDTA	7.5	มิลลิลิตร
Sarkosyl	0.1	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	20	มิลลิลิตร

7.2 2.5 M NaCl/20% PEG 8000

2.5 M NaCl
PEG-8000

ผสมสารโซเดียมคลอไรด์ 14.16 กรัมกับ PEG-8000 20 กรัม ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 80 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

8. สารเคมีสำหรับการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

8.1 5xTBE

Tris base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8)	20.0	มิลลิลิตร

ละลาย Tris 54.0 กรัม กับ Boric acid 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 800 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน เติม EDTA (pH 8) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

8.2 Loading dye

Deionized formamide	95%
Bromophenol blue	0.1%
EDTA (pH 8)	10 มิลลิโมลาร์

ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8.3 Ethidium bromide (EtBr) (10 mg/ml)

ละลายสาร ethidium bromide 1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ใส่ในภาชนะทึบแสง หรือใช้แผ่น aluminum foil หุ้มภาชนะ ปิดให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการเตรียมสารนี้ต้องใส่ถุงมือและระวังไม่หายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

ภาคผนวก ข

ตาราง 1 การหาค่า Tm โดยเทียบระหว่างค่า GC content กับจำนวนเบสทั้งหมดในสายไฟรเมอร์

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
12	19	21	23	25	27	29	31	33	36	38	40
13	22	24	26	28	31	33	35	37	39	41	43
14	25	27	29	31	33	35	37	39	41	44	46
15	27	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48
16	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
17	31	33	35	38	40	42	44	46	48	50	52
18	33	35	37	39	41	43	45	47	49	51	54
19	34	37	39	41	43	45	47	49	51	53	55
20	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56
21	37	39	41	43	45	47	49	51	53	55	57
22	38	40	42	44	46	48	50	52	54	57	59
23	39	41	43	45	47	49	51	53	55	58	60
24	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60
25	41	43	45	47	49	51	53	55	57	59	61
26	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62
27	42	44	46	48	50	53	55	57	59	61	63
28	43	45	47	49	51	53	55	57	59	61	63
29	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64
30	44	46	48	50	52	54	56	58	61	63	65
31	45	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65
32	45	47	49	51	53	55	57	60	62	64	66
33	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66
34	46	48	50	52	54	56	58	60	63	65	67
35	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67
36	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67
37	47	49	51	53	55	58	60	62	64	66	68
38	48	50	52	54	56	58	60	62	64	68	68
39	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68
40	48	50	52	54	57	59	61	63	65	67	69

ตาราง 1 การหาค่า Tm โดยเทียบระหว่างค่า GC content กับจำนวนเบสทั้งหมดในสายไฟรเมอร์

	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
12	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60
13	45	47	49	51	53	55	57	59	61	63
14	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66
15	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68
16	52	54	56	58	60	62	64	66	69	71
17	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72
18	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74
19	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75
20	58	60	62	65	67	69	71	73	75	77
21	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78
22	61	63	65	67	69	71	73	75	77	79
23	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80
24	63	65	67	69	71	73	75	77	79	81
25	63	65	67	70	72	74	76	78	80	82
26	64	66	68	70	72	74	76	78	81	83
27	65	67	69	71	73	75	77	79	81	83
28	66	68	70	72	74	76	78	80	82	84
29	66	68	70	72	74	76	78	80	83	85
30	67	69	71	73	75	77	79	81	83	85
31	67	69	71	73	75	77	80	82	84	86
32	68	70	72	74	76	78	80	82	84	86
33	68	70	72	74	76	78	81	83	85	87
34	69	71	73	75	77	79	81	83	85	87
35	69	71	73	75	77	79	81	83	85	88
36	69	72	74	76	78	80	82	84	86	88
37	70	72	74	76	78	80	82	84	86	88
38	70	72	74	76	78	80	83	85	87	89
39	71	73	75	77	79	81	83	85	87	89
40	71	73	75	77	79	81	83	85	87	89

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายรัฐกร ศรีสุทธิ
วัน เดือน ปีเกิด	14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2523
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2538 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2541 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2545
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนอุดหนุนบัณฑิตศึกษา โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved