ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารเอนไซม์สกัด (extraction buffer)

A: 0.2 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane ชั่ง Tris 2.42 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

B: 0.2 M HCl ตวง HCl (37%) 1.7 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

<u>วิธีการเตรียม</u>

1. ตวง A 50 มิลลิลิตร ผสม B 16.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้200 มิลลิลิตร

2. ปรับ pH ให้ได้ 8.4 ด้วย 0.2 M HCl

3. ใส่ลงในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม electrode buffer (5x) pH 8.3

Tris	3.00	กรัม
Glycine	14.4	กรัม

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ละลาย Tris 3.00 กรัม และ glycine 14.4 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร
2. ปรับ pH ให้ได้ 8.3 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl ผสมน้ำกลั่นให้ครบ500 มิลลิลิตร
3. เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. เมื่อจะใช้ตวงสาร 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

3. การเตรียม marker dye solution

bromophenol blue	0.05	กรัม
glycerol	1.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียมส่วนประกอบของเจล

stock A : acrylamide stock 30 เปอร์เซ็นต์

acrylamide	29.20	กรัม
N,N'-methylene bis acrylamide	0.80	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตรและเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

stock B : 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.8

สาร X : Tris HCl	1.41	กรัมต่อน้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร
สาร Y : 0.1 M HCl	0.83	มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำสารละลาย X : 50.00 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย Y : 8.10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย NaOH หรือ HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร กรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

stock C : 10% ammonium persulfate

ammonium persulfate	0.10	กรัม
น้ำกลั่น	1.00	มิลลิลิตร

Stock Solution	% separating gel	
	7	8.5
acrylamide 30 % (มิลลิลิตร)	5	5.66
น้ำกลั่น (ml.)	9.7	9.04
1.0 M Tris – HCl pH 8.8 (มิลลิลิตร)	5	5
APS 10 % (ไมโครลิตร) (เตรียมโดยชั่งสาร 0.1 g. ผสมน้ำ 1(มิลลิลิตร)	200	150
TEMED (ไมโครลิตร)	10	10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีเตรียม

1. ผสมน้ำกลั่น กับ 3 M. Tris pH 8.8 และ acrylamide 30 % เข้าด้วยกัน แล้วค่อยๆ เติม APS. 10 % และ TEMED คนให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

5. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมเอนไซม์

5.1 Acid phosphatase (ACP)

A: acetate buffer 0.2 M pH 4.8	50 มิลลิลิตร
B: fast ganet GBC disodium salt	0.05 กรัม
C: disodium α - naphthyl phosphate	0.025 กรัม

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ผสมสาร A+B+C ให้เข้ากัน กรองในที่มืด
2. เทสารท่วมเจล เก็บไว้ในที่มืด (ใช้เวลาประมาณ 2- 12 ชม.)

5.2 Esterase (EST)

A: phosphate buffer 0.2 M pH 6.0	100 มิลลิลิตร
B: fast blue B - salt	0.15 กรัม
C: α-naphthyl acetate (ละลายในabs. ethanol 3 มิลลิลิตร)	0.003 กรัม

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ผสมสาร A+B ละลายให้เข้ากัน กรองในที่มืด แล้วค่อยๆเติม C ลงไปผสม
2. เทใส่เจลให้ท่วม เก็บไว้ในที่มืด (ใช้เวลาประมาณ 20- 30 นาที)

5.3 Peroxidase (POX)

A: 3-amino-9-ethylcarbazol (ละลายใน acetone 15 มิลลิลิตร ผสมในที่มืด)	0.063 กรัม
B: β-naphthol (ละลายใน acetone 15 มิลลิลิตร ผสมในที่มืด)	0.044 กรัม
C: Tris – buffer 0.1 M pH 4.0	120 มิลลิลิตร
D: 3 % H_2O_2 (เตรียมจาก H_2O_2 30 % 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 1 มิลลิลิตร)	150 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

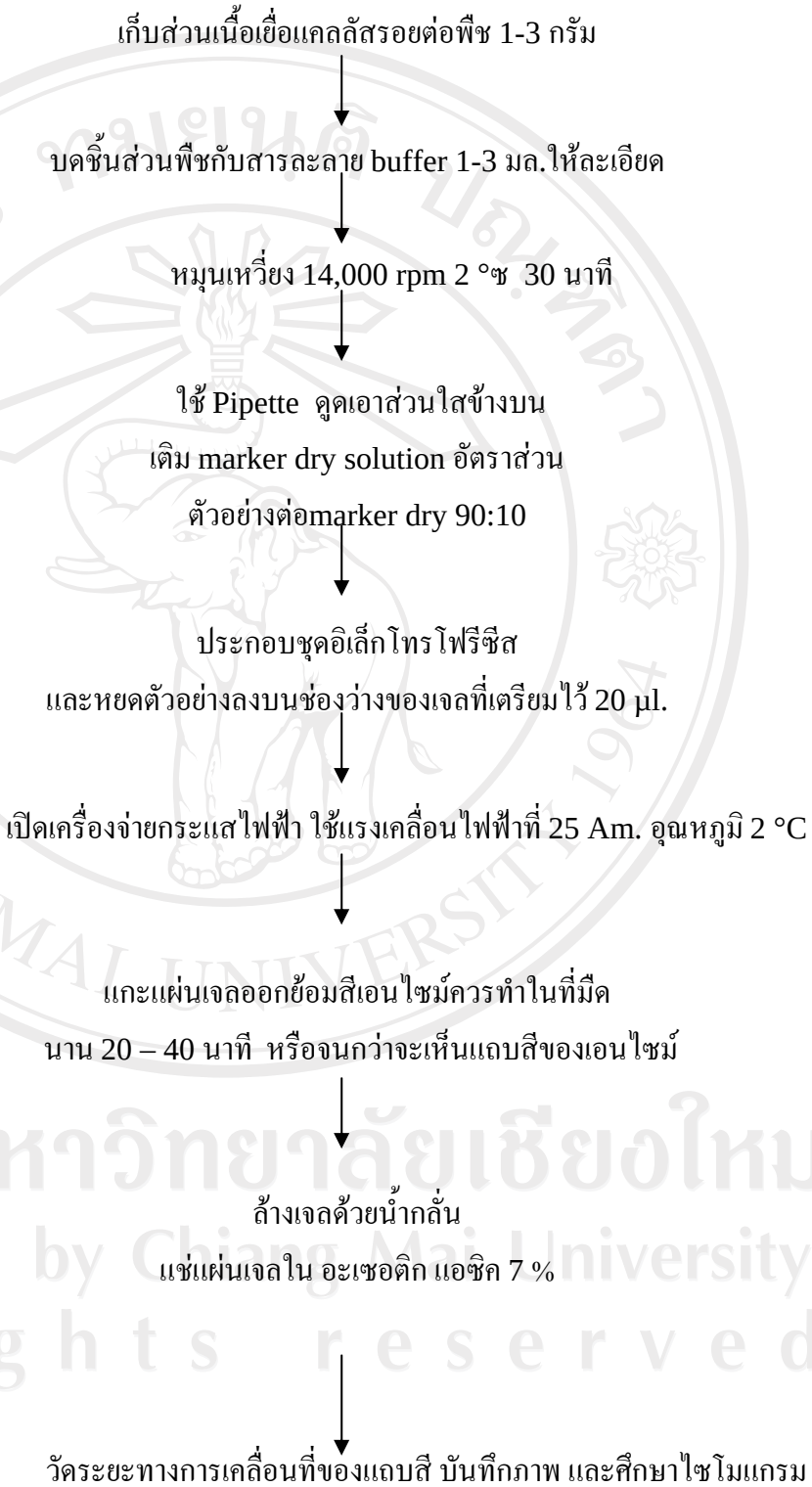
วิธีเตรียม

1. ผสมสาร C +A+B ให้เข้ากัน (ผสมในที่มืด) ผสม D ให้เข้ากัน
2. เทใส่เจลให้ท่วม เก็บไว้ในที่มืด (ใช้เวลาประมาณ 20- 30 นาที)

6. น้ำยาเก็บรักษาเจลและล้างสีส่วนเกิน

กรดกลาเชียลอะซีติก	35.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	465.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพผนวกที่ 1 ขั้นตอนในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส เพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

อัตราส่วนน้ำยา FAA 70 %

สารเคมี	ปริมาตร (มิลลิลิตร/ 100 มิลลิลิตร)
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	70
กรดกลาเชียลอะซีติก (glacial acetic acid)	5
ฟอร์มาลิน (formalin)	10
น้ำกลั่น	10

การเตรียมสีย้อมเนื้อเยื่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สี ซาฟรานินโอ และฟาสท์กรีน ตามลำดับ

l. ส่วนประกอบสีซาฟรานินโอ มีดังนี้

ซาฟรานินโอ	1	กรัม
เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

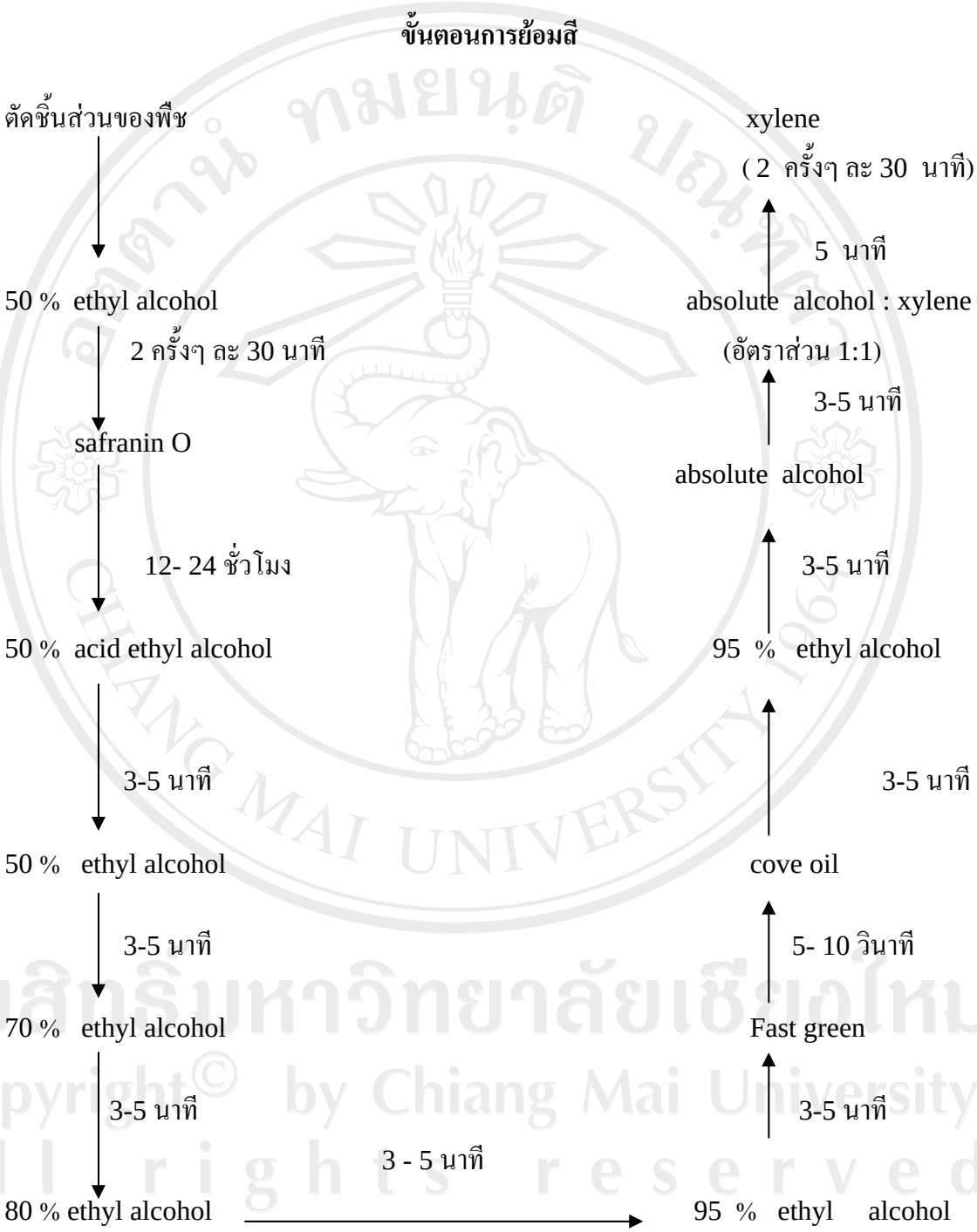
ถ้าสีย้อมติดเนื้อเยื่อมากเกินไป สามารถล้างออกได้ด้วย เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่หยดกรด ไฮโดรคริกhydrochloric หรือ acetic acid ลงไปเล็กน้อย

2. ส่วนประกอบของฟาสท์กรีน มีดังนี้

ฟาสท์กรีน	0.5	กรัม
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

การเตรียมสีทั้งสองชนิด ก่อนนำไปใช้ควรกรองสีด้วยกระดาษกรอง เพื่อให้สีสะอาดปราศจากเศษผงสีที่ไม่ละลายไปติดชิ้นส่วนที่ทำการย้อม และสามารถล้างสีที่ติดมากเกินไปออกด้วยสารละลายที่มีส่วนผสม เอทานอลบริสุทธิ์ : clove oil : ไซลีน อัตราส่วน1:2:1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพผนวกที่ 2 ขั้นตอนการย้อมสี Safranin O – Fast green

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์สูตรของ Haupt's adhesive มีส่วนประกอบดังนี้

เจลาติน (gelatin)	1	กรัม
ฟีนอลคริสตัส (Phenol crystals)	2	กรัม
กลีเซอรีน (glycerine)	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ละลายเจลาติน 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส
2. เติมสารฟีนอลคริสตัส 2 กรัม และ กลีเซอรีน 15 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
3. กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บขวดสีชา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) ผลการงอกของเมล็ดน้อยหน่าชนิดต่างกันที่ใช้เป็นต้นตออะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	649.5000	81.1875	6.42	0.0002**
Error	24	341.5000	12.6481		
Total	32	991.0000	28.3143		

CV. = 17.6352 (%)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลสำเร็จการต่อกิ่งอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างที่ 30 วัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	38.0975	4.7622	0.66	0.7248ns
Error	24	195.6667	7.2469		
Total	32	233.7643	6.6790		

CV. = 11.3566 (%)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลสำเร็จการต่อกิ่งอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างที่ 60 วัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	19.1392	2.3924	0.11	0.9976 ns
Error	24	568.3251	21.0491		
Total	32	587.4643	16.7847		

CV. = 20.1004 (%)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลความสูงต้นอะติโมย่าแอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่ง

Source	**df**	**SS**	**MS**	**F**	**F-Prob**
Treatment	8	24872.5217	3109.0652	2.66	0.00**
Error	24	18208.4348	91.9618		
Total	32	43080.9565	209.130935		

CV. = 18.2132 (%)

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นเหนือรอยต่ออะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกันที่ 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่ง

Source	**df**	**SS**	**MS**	**F**	**F-Prob**
Treatment	8	5.4572	0.6821	27.08	0.0000**
Error	24	4.5340	0.0252		
Total	32	9.9912	0.0531		

CV. = 14.7765 (%)

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นใต้รอยต่ออะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน ที่ 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่ง

Source	**df**	**SS**	**MS**	**F**	**F-Prob**
Treatment	8	2.6462	0.3308	18.23	0.0000**
Error	24	4.0822	0.0181		
Total	32	6.7284	0.0289		

CV. = 17.4118 (%)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลจำนวนกิ่งเฉลี่ยต่อต้นของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	5004.2415	625.5302	5.70	2.66ns
Error	24	21731.4783	109.7549		
Total	32	26735.7198	129.7850		

CV. = 40.9250 (%)

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลจำนวนใบเฉลี่ยต่อต้นของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกันที่ 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่ง

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	13.7422	1.7178	1.89	0.0623 *
Error	24	196.3200	0.9089		
Total	32	210.0622	0.9378		

CV. = 34.6535 (%)

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลพื้นที่ใบเฉลี่ยต่อต้นของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	101.6692	12.7087	0.70	0.6950ns
Error	24	1804.9086	18.2314		
Total	32	1906.5779	17.8185		

CV. = 8.5507 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลจำนวนรากใหญ่ของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์เมื่อ 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่งบนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	470.0741	58.7593	2.66	0.0400*
Error	24	397.3333	22.0741		
Total	32	867.4074	33.3618		

CV. = 22.2162 %

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลจำนวนรากแขนงอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์ เมื่อ 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่งบนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	46956.2403	5869.5300	5.37	0.0006*
Error	24	29486.0001	1092.0741		
Total	32	76442.2404	2184.0640		

CV. = 31.1759 %

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลความยาวรากอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์ เมื่อ 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่งบนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	1307.3333	163.4167	4.54	3.71*
Error	24	647.3333	35.9630		
Total	32	1954.6667	75.1795		

CV. = 26.7189 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลน้ำหนักแห้งต้นอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์ เมื่อ 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่งบนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	150.8300	18.8537	3.52	0.0044 ns
Error	24	92.6097	5.3503		
Total	32	343.4396	7.8054		

CV. = 18.8170 %

ตารางภาคผนวกที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลน้ำหนักแห้งรากอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์ เมื่อ 48 สัปดาห์หลังต่อกิ่งบนต้นตอน้อยหน่าชนิดต่างกัน

Source	df	SS	MS	F	F-Prob
Treatment	8	206.8345	25.8543	0.52	0.833 ns
Error	24	1786.0105	49. 6114		
Total	32	1992.8450	45.2919		

CV. = 30.3994 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายมณเฑียน แสนดะหมื่น

วัน เดือน ปี เกิด 8 กุมภาพันธ์ 2519

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนบางลี่วิทยา อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี ปีการศึกษา 2535
สำเร็จการศึกษาประกาศนียบัตรวิชาชีพ วิทยาลัยเกษตรกรรมสิงห์บุรี ปีการศึกษา 2538
สำเร็จการศึกษาประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง วิทยาลัยเกษตรกรรม และ เทคโนโลยีสิงห์บุรี ปีการศึกษา 2540
สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาพืชศาสตร์ (พืชสวนประดับ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปีการศึกษา 2542

ประสบการณ์ทำงาน
- ผู้จัดการ แปลงเพาะชำและขยายพันธุ์ส้ม บริษัท เชียงใหม่ธนาธร จำกัด
- เจ้าหน้าที่สถานเพาะชำ สถานีเกษตรหลวงปางดะ มูลนิธิโครงหลวง

ประสบการณ์ดูงาน 2002 : Training course for pomologist of The Royal Project Foundation Supported by International Cooperation and Development Fund (ICDF.) from National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan R. P. C.

ผลงานวิจัย
- หัวหน้าโครงการวิจัยศึกษาวิธีการผลิตต้นกล้าและวิธีการเปลี่ยนพันธุ์อะโวคาโด้ ปี 2544 ทุนวิจัยจากมูลนิธิโครงการหลวง
- ร่วมเป็นนักวิจัยโครงการศึกษาอิทธิพลของชนิดของตาดอกและพันธุ์ที่มีผลต่อการเสียบตาดอกสาลี่ ปี 2545 ทุนวิจัยจากมูลนิธิโครงการหลวง
- หัวหน้าโครงการวิจัยศึกษาและคัดเลือกพันธุ์น้อยหน่าลูกผสมบางพันธุ์บนพื้นที่สูง ปี 2547-2548 ทุนวิจัยจากมูลนิธิโครงการหลวง
- อิทธิพลของอายุต้นตอและชนิดของกิ่งพันธุ์ดีต่อผลสำเร็จของการต่อกิ่งแบบ Epicotyl Grafting ในอะโวคาโด้. 2549.

E-mail saendamuen_m@yahoo.com

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved