ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย

1. Extraction buffer (Modified Doyle and Doyle (1990))

200 mM Tris-HCl pH 8.0

250 mM NaCl

25 mM EDTA

0.5% SDS

คำนวณปริมาณสารให้ได้ตามความเข้มข้นดังกล่าว แล้วนำมาผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. SDS Extraction buffer (Kuntapanom and Ikeda (1998))

Tris base	1.817	กรัม
Boric acid	0.9270	กรัม
0.5 M EDTA	1.00	มิลลิลิตร
SDS	2.00	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA	18.612	กรัม

น้ำกลั่น

ละลาย EDTA ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 8.0 เมื่อละลายหมดแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. 5 M NaCl

NaCl	29.2	กรัม

น้ำกลั่น

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. 1 M Tris-HCl

Tris base	121.1	กรัม

น้ำกลั่น

ละลาย Tris base ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.5 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ

6. TE buffer

Tris base	12.1	กรัม
0.5 M EDTA	200	ไมโครกรัม

ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

7. 50x TAE buffer

Tris base	242	กรัม
Glacial Acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	100	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. 10x TBE buffer

Tris base	121	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA	40	มิลลิลิตร

ผสมสารเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

9. AFLP loading buffer

Bromophenol blue	0.05	กรัม
Xylenecyanol	0.05	กรัม
0.5 M EDTA	1	มิลลิลิตร
Formamide	49	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

10. Bi-Silane

Acetic acid	50.00	ไมโครลิตร
Ethanol	1	มิลลิลิตร
Bi-Silane (stock)	1.5	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

11. Proteinase K buffer

0.5 M Tris-HCl pH 7.5	200	ไมโครลิตร
$CaCl_2$	0.0294	กรัม
Glycerol	5	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

12. 1XTNE buffer (RNase I buffer)

0.5 M Tris-HCl pH7.5	1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	100	ไมโครลิตร
NaCl	0.299	กรัม

ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

13. Phenol

Phenol	100	กรัม
8-hydroxy-quinoline	0.1	กรัม
β- mercaptoethanol	200	ไมโครลิตร

0.1 M และ 1 M Tris-HCl pH 8

นำผลึก phenol มาหลอมในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่ 65 องศาเซลเซียส เมื่อละลายหมดแล้ว เติม 8-hydroxy-quinoline กวนอย่างแรงด้วย magnetic stirrer จากนั้นเติม 1 M Tris-HCl pH 8.0 100 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันอย่างแรงอย่างน้อย 5 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง แล้วเติม 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 กวนให้เข้ากันอย่างแรงประมาณ 20 นาที ตั้งทิ้งเอาไว้ให้แยกชั้น แล้วดูดเอาสารละลายด้านบนออก สกัดด้วย 0.1 M สลับกับ 1 M Tris-HCl pH 8.0 ซ้ำจนกว่า phenol จะมี pH มากกว่า 7.8 เมื่อได้ phenol pH 7.8 แล้วเติม β- mercaptoethanol และเติม 1M Tris-HCl pH 8.0 ปิดผิวสารละลาย เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

14. 40% polyacrylamide (19:1)

Acrylamide	150	กรัม
Bis-acrylamide	8	กรัม

ละลาย Acrylamide ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นเติม Bis-acrylamide ผสมจนสารละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 400 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส

15. 6% polyacrylamide gel

urea	29.4	กรัม
40% polyacrylamide	10.5	มิลลิลิตร
10% TBE	7	มิลลิลิตร
10% APS	400	ไมโครลิตร
TE MED	30	ไมโครลิตร

ชั่ง urea 29.4 กรัม เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟ พอให้ urea ละลาย เมื่อ urea ละลายแล้ว ทิ้งให้สารละลายมีอุณหภูมิเย็นลง จากนั้นเติม 10xTBE 40% polyacrylamide กวนให้เข้ากัน แล้วจึงเติม 10%APS ปรับปริมาตรให้ได้ 70 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น เติม TE MED กวนให้เข้ากัน จะได้ 6% polyacrylamide gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว กฤษณา วงค์ปัญญา

วันเดือนปีเกิด 3 มิถุนายน 2523

ประวัติการศึกษา
- สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนเทิงวิทยาคม จังหวัดเชียงราย ปีการศึกษา 2541
- สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชสวน จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2545

ทุนการศึกษา ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการย่อยบัณฑิตศึกษา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในระดับปริญญาโท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved