ภาคผนวก ก

การศึกษาทางกายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อ โดยวิธีการ paraffin embedding

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชและสไลด์ถาวร

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการเก็บตัวอย่างพืชสำหรับฆ่าและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) คือ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

ethyl alcohol (95%)	50	มิลลิลิตร
formalin	10	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35	มิลลิลิตร

2. น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนผสมและอัตราส่วนของสารเคมีในการเตรียมน้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์

สารเคมี	ระดับแอลกอฮอล์ (%)				
	50	70	85	95	100
95% ethyl alcohol	40	50	50	45	-
absolute ethyl alcohol	-	-	-	-	25
tertiary butyl alcohol	10	20	35	55	75
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-

3. พาราฟินเหลว
4. สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ Parplast
5. น้ำยาสำหรับยึดเนื้อเยื่อให้ติดบนแผ่นสไลด์ (adhesive) ได้แก่ albumin ซึ่งมีส่วนผสมและอัตราส่วนในการเตรียม stock solution ดังนี้

ไข่ขาว	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	49	มิลลิลิตร

นำ stock solution 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. น้ำยาสำหรับทำเนื้อเยื่อให้สะอาด (clearing reagent) ได้แก่ xylene
7. สีสังเคราะห์สำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ คือ Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วย

aluminium sulfate $[Al_2(SO_4)_3.16H_2O$	400	มิลลิลิตร
hematoxylin ($C_6H_{14}O_6$)	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มิลลิลิตร
methyl alcohol	100	มิลลิลิตร
glycerol	100	มิลลิลิตร

8. สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การศึกษาทางเซลล์วิทยา

1. การเตรียมน้ำยาหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment)

para-dichlorobenzene	10	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ผสม para-dichlorobenzene และน้ำทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำมาคนให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย megnetic stirrer ที่ 60 °ซ

2. เตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative)

absolute ethanol	3	ส่วน
glacial acetic acid	1	ส่วน

3. การเตรียมน้ำยาแยกเซลล์

hydrochloric acid 1N

4. การเตรียมสีย้อม carbol fuchsin

4.1 ชั่งสาร basic fuchin 3 กรัม ละลายใน 100 มิลลิลิตร alcohol 70% (ethanol) เก็บใส่ขวดสีชาไว้ในตู้เย็น (สามารถเก็บไว้ได้นาน) = Fluid A

4.2 ตวง Fluid A 10 มิลลิลิตร ผสมในสารละลาย 5% phenol 90 มิลลิลิตร = Fluid B

4.3 ตวง Fluid B 55 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid 6 มิลลิลิตร และ 37% Formaldehyde = Fluid C

4.4 ตวง Fluid C 5 มิลลิลิตร หรือ 10 มิลลิลิตร แล้วเติม 45% acetic acid 95 มิลลิลิตร และ 1.8 กรัม sorbitol นำมาคนให้เป็นเนื้อเดียวด้วย megnetic stirrer หลังจากนั้นกรองใส่ขวดสีชา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

สารเคมีและการเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์

1. น้ำยาสกัดเอนไซม์ (extraction buffer)

สารที่ใช้เป็นน้ำยาสกัดเอนไซม์ คือ Tris (hydroxymethyl) aminomethane หรือ Tris-buffer 0.2 M pH 8.4

0.2 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane	100 มิลลิลิตร
0.2 M HCL	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมทำโดยการนำ 0.2 M Tris ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 M HCL ปริมาตร 16.5 มิลลิลิตร และปรับ pH 0.2 M HCL ให้ได้ pH 8.4 หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ separating gel 7.5 % แสดงในตารางภาคผนวกที่ 2

ตารางภาคผนวก 2 ส่วนผสมสำหรับการเตรียม separating gel 7.5 %

Stock solution	separating gel 7.5 %
น้ำกลั่น	9.7 มิลลิลิตร
1.0 M Tris – HCL pH 8.8	5 มิลลิลิตร
Acrylamide 30 %	5 มิลลิลิตร
APS 10 % (เตรียมก่อนใช้)	200 ไมโครลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร

เตรียม separating gel ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น กับ 1.0 M Tris – HCL pH 8.8 และ Acrylamide 30 % เข้าด้วยกัน แล้วค่อย ๆ เติม APS 10 % และ TEMED คนให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม electrode buffer

Tris	6.0 กรัม
Glycine	28.8 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมสารละลายโดยการละลาย Tris 6.0 กรัม และ Glycine 28.8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.3 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCL เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม marker dye

Bromophenol blue	0.05 กรัม
Glycerol	1.00 มิลลิลิตร
Tris – HCL buffer pH 6.7	10 มิลลิลิตร

5. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

5.1 acid phosphatase (ACP)

สารเคมี

1. stock A : Acetone buffer 0.2 M pH 4.8	50 มิลลิลิตร
2. stock B : Fast ganet GBC disodium salt	0.05 กรัม
3. stock C : D isodium α naphtyl phosphate	0.025 กรัม

ผสม A , B และ C ให้เข้ากัน นำไปย้อมเจลในที่มืด

5.2 esterase (EST)

สารเคมี

1. stock A : Phosphate buffer 0.2 M pH 6.0	100 มิลลิลิตร
2. stock B : Fast bule – B salt	0.15 กรัม
3. stock C : α – naphtylacetate	0.003 กรัม

ผสม A และ B ให้เข้ากัน กรองในที่มืด แล้วค่อย ๆ เติม C ลงไปผสม นำไปย้อมเจลในที่มืด

5.3 peroxidase (POX)

สารเคมี

1. stock A : 3 amino- 9 ethylcarbazole	0.042 กรัม
β-napthol	0.029 กรัม
acetone	200 มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณภูมิตู้เย็น

2. stock B : Tris buffer 0.1 M pH 4.0

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	0.754 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Acetic acid 0.81 กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ให้ได้ 4.0 ด้วย NaOH หรือ HCL ที่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

3. stock C : H_2O_2 3 เปอร์เซ็นต์

เตรียมจาก H_2O_2 3 เปอร์เซ็นต์ 10.0 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

วิธีการเตรียม ผสม stock A และ B ให้เข้ากันก่อน แล้วผสม C ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปย้อมเจลในที่มืด

6. การเตรียมน้ำยา fix (กรดแอซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์)

Acetic acid	70 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	930 มิลลิลิตร
Glycerol	20 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

การเตรียมน้ำปุ๋ย สูตร CMU-RPF

(Chiang Mai University - Royal Project Foundation)

1. ชั่งแม่ปุ๋ยตามตารางภาคผนวกที่ 2 โดยแยกเป็น 2 ถัง ดังนี้

การเตรียมปุ๋ยในถัง A

ชั่งแม่ปุ๋ยตามลำดับให้ครบตามถัง A (ตารางภาคผนวกที่ 3) และละลายปุ๋ยที่ละชนิดด้วยน้ำ กรองด้วยผ้าขาวบางก่อนเทลงถังขนาด 20 ลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ลิตร

การเตรียมปุ๋ยในถัง B

ชั่งแม่ปุ๋ยตามลำดับให้ครบตามถัง B ปฏิบัติเช่นเดียวกับ 1.1

2. การนำไปใช้ ตวงน้ำแม่ปุ๋ยจากถัง A และ B อย่างละ 1 ลิตร ผสมน้ำ 200 ลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 3

แม่ปุ๋ย	ปริมาณปุ๋ยที่ใช้ (กรัม)	
	ถัง A (กรัม/10 ลิตร)	ถัง B (กรัม/10 ลิตร)
$NH_4H_2PO_4$	500	-
$MgSO_4.7H_2O$	400	-
$(CaNO_3)_2.4H_2O$	-	1100
KNO_3	610	610
Unilate	25	-

ความเข้มข้นของธาตุอาหารในสารละลาย

ธาตุอาหารหลัก (ppm)

NO_3^-	NH_4^+	P	K	Ca	Mg	S
79.3	30	152.5	280.6	93.5	19.8	26

ธาตุอาหารจาก Unilate ของบริษัท เอฟ.อี. ซิลลิก (กรุงเทพฯ จำกัด) (ppm)

Mg	Mn	Fe	Cu	Zn	Co	B	Mo
0.3	0.19	0.19	0.06	0.06	0.004	0.04	0.004

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวรัตติกาล พวงทอง
วัน เดือน ปีเกิด	10 มีนาคม 2525
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้	121/22 หมู่ 7 ตำบลฟ้าฮ่าม อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50000
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนนวมินทราชูทิศ พายัพ จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2539
	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทราชูทิศ พายัพ จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2542
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ (พืชผัก) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved