ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอ

ในการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอต้องเตรียม stock solution ก่อนดังนี้

5M NaCl (50 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร NaCl มาจำนวน 14.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA (pH 8.0) (100 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร disodium ethylenediamine tetraacetate·$2H_2O$ (EDTA) มาจำนวน 18.612 กรัม ละลายในน้ำ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1M Tris - HCl pH 8.0 (100 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร Tris - HCl มาจำนวน 15.76 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

Chloroform/isoamyl alcohol (24:1) (100 มิลลิลิตร)

ตวงสาร Chloroform ปริมาตร 96 มิลลิลิตร ผสมกับสาร isoamyl alcohol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอตามวิธีของ Dellaporta *et al*. (1983)

Grinding Buffer (1 ลิตร)

K_2HPO_4	16.70 กรัม
KH_2PO_4	4.10 กรัม
Sucrose	100.00 กรัม
PVP-10 หรือ PVP-40	5.00 กรัม
dH2O	1.00 ลิตร

ชั่งสารดังกล่าวมาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นแบ่งใส่ขวดแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำสารละลายที่เตรียมนี้ไปใช้ให้เติม 100 mM Ascobic acid จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 20 มิลลิลิตร และเติมสาร BSA (bovine serum albumin fraction V) จำนวน 30 มิลลิกรัม ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปรับ pH ให้เป็น 7.6

2 เปอร์เซ็นต์ CTAB buffer (100 มิลลิลิตร)

CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide)	2.00 กรัม
NaCl	5.84 กรัม
Tris base	1.21 กรัม
EDTA	0.74 กรัม
1 เปอร์เซ็นต์ PVP-40	0.50 กรัม
dH_2O	100.00 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชั่งสารดังกล่าวข้างต้นมาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้เติม 0.2เปอร์เซ็นต์ Mercaptoethanol

การเตรียมสารละลายสำหรับเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

5X TBE buffer (1 ลิตร)

Tris base	54.00 กรัม
Boric acid	27.50 กรัม
500 mM EDTA pH 8.0	20 มิลลิลิตร

นำสาร Tris base และ Boric acid มาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม EDTA pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

0.5X TBE buffer (1 ลิตร)

5X TBE buffer	100 มิลลิลิตร
dH_2O	900 มิลลิลิตร

1เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล (agarose gel) (30 มิลลิลิตร)

Agarose gel	0.30 กรัม
0.5xTBE buffer	30 มิลลิลิตร

ชั่งอะกาโรสเจล 0.3 กรัม ละลายใน 0.5X TBE ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายโดยใช้ไมโครเวฟ ทิ้งให้เย็นสักครู่จึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณครึ่งชั่วโมง ค่อยๆ ดึงหวีออก ย้ายแผ่นเจลใส่ในเครื่อง Gel MateTMGEP 102 (TOYOBO, Japan) แล้วเติม TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Loading dye (10 มิลลิลิตร)

Bromophenol blue	0.25 เปอร์เซ็นต์
Xylene cyanol	0.25 เปอร์เซ็นต์
Glycerol	50.00 เปอร์เซ็นต์
0.5 EDTA, pH 8	20 ไมโครลิตร

เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัด dsRNA

10X STE buffer (1 ลิตร)

Tris base	61.00 กรัม
NaCl	58.00 กรัม
EDTA	3.70 กรัม

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

Extraction buffer (100 มิลลิลิตร)

10X STE buffer	20 มิลลิลิตร
SDS	2.00 กรัม
Polyvinylpyrolidone-40	1.00 กรัม

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16 เปอร์เซ็นต์ Ethanol in STE (100 มิลลิลิตร)

10X STE buffer	10.00 มิลลิลิตร
95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol	17.40 มิลลิลิตร
dH_2O	72.60 มิลลิลิตร

1X STE (100 มิลลิลิตร)

10X STE buffer	10.00 มิลลิลิตร
dH_2O	90.00 มิลลิลิตร

Choroform/pentanol (24:1) (100 มิลลิลิตร)

ตวงสาร Choroform ปริมาตร 96 มิลลิลิตร ผสมกับสาร pentanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1M Sodium acetate (100 มิลลิลิตร)

NaOAc	26.60 กรัม
dH_2O	100 มิลลิลิตร

50mM Sodium acetate (100 มิลลิลิตร)

1M NaOAc	5 มิลลิลิตร
dH_2O	95 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว ขวัญดาว ผิวขาว
วัน เดือน ปีเกิด	30 ธันวาคม 2527
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2546 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนรังษีวิทยา จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนอุดหนุนบัณฑิตศึกษา ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
ประสบการณ์	- เข้าร่วมเสนอผลงานโปสเตอร์ เรื่อง ‘‘Biological control of Pomelo balck spot disease’’ ในงานการประชุมวิชาการราวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 11-12 ตุลาคม 2551 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น -เข้าร่วมเสนอผลงานโปสเตอร์ เรื่อง ‘‘การตรวจสอบโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ในสวนส้มโอที่ผลิตเพื่อการส่งออกที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย’’ ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 6-9 พฤษภาคม 2552 โรงแรม ดิ เอ็มเพรส อ.เมือง จ. เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รางวัลที่ได้รับ	รางวัลโปสเตอร์ดีเด่น เรื่อง ‘‘การตรวจสอบโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ในสวนส้มโอที่ผลิตเพื่อการส่งออกที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย’’ ในการนำเสนอผลงานวิชาการ ภาคโปสเตอร์สาขาไม้ผล/ไม้ยืนต้น ประเภทนักศึกษา ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 6-9 พฤษภาคม 2552 โรงแรม ดิ เอ็มเพรส อ.เมือง จ. เชียงใหม่
งานวิจัย	งานวิจัยปัญหาพิเศษระดับปริญญาโท เรื่อง ‘‘การควบคุมโรคของส้มโอโดยชีววิธี’’ ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved