ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
วุ้น	18	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วมาหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม กรองเอาแต่น้ำ แล้วเติม dextrose ลงไป นำน้ำที่เหลือ 500 มิลลิลิตรมาต้มวุ้นจนใส จึงนำมาเทรวมกับน้ำมันฝรั่ง คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แบ่งใส่ขวดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

Potato carrot agar (PCA) slant

มันฝรั่ง	20	กรัม
แครอท	20	กรัม
วุ้น	18	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

นำมันฝรั่ง และแครอทที่ปอกเปลือกแล้วมาหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งและแครอทเริ่มนิ่ม กรองเอาแต่น้ำ นำน้ำที่เหลือ 500 มิลลิลิตรมาต้มวุ้นจนใส จึงนำมาเทรวมกับน้ำมันฝรั่งและแครอท คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดแก้ว แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที นำออกมาวางเอียงไว้ รอจนอาหารแข็งและไอน้ำระเหยหมดจึงนำมาใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2% Water agar (WA)

วุ้น	20	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

นำน้ำทั้งหมดมาต้มวุ้นจนใส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แบ่งใส่ขวด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

Potato dextrose broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วมาหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร แล้วนำไปจนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม กรองเอาแต่น้ำ แล้วเติม dextrose ลงไป ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตรขวดละ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

การเตรียมสีย้อมนิวเคลียส

Phosphate buffer

KH_2PO_4	6.808	กรัม
NaOH	0.882	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

ละลายสารทั้ง 2 ในน้ำ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.75 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

Geimsa stain stock solution

Geimsa stain	1	กรัม
glycerol	66	มิลลิลิตร
methyl alcohol	66	มิลลิลิตร

นำ phosphate buffer 99 ส่วนผสมกับ Geimsa stain stock solution 4 ส่วนก่อนการย้อม และควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

การเตรียมสารเคมีและสารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

0.5M EDTA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง disodium ethylenediamine tetraacetate • $2H_2O$ (EDTA) 18.612 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1M Tris (pH 8.0) ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Tris base 121.14 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย HCl ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5M NaCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่ง NaCl 14.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2X CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)	2	กรัม
1M Tris (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	4	มิลลิลิตร
5M NaCl	28	มิลลิลิตร
น้ำ	56	มิลลิลิตร

10% CTAB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

CTAB	1	กรัม
5M NaCl	1.4	มิลลิลิตร
น้ำ	8.6	มิลลิลิตร

CTAB precipitation buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

CTAB	0.3	กรัม
1M Tris (pH 8.0)	1.5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	3	มิลลิลิตร
น้ำ	25.5	มิลลิลิตร

High-salt TE buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1M Tris (pH 8.0)	0.1	มิลลิลิตร
5M NaCl	2	มิลลิลิตร
น้ำ	7.9	มิลลิลิตร

0.1X TE ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

1M Tris (pH 8.0)	0.2	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	0.04	มิลลิลิตร
น้ำ	199.76	มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีสำหรับเจลอิเล็กโตรโฟเรสิส

10X TBE buffer

Tris base	108	กรัม
boric acid	55	กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติม 0.5M EDTA (pH 8.0) 40 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

Loading dye

bromophenol blue	0.25%
xylene cyanol	0.25%
สารละลาย sucrose	40%

ผสมสารทั้ง 3 เข้าด้วยกัน นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ตารางภาคผนวกที่ 1 ตำแหน่งจดจำ และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์	ตำแหน่งจดจำ	อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา	อุณหภูมิในการหยุดปฏิกิริยา
*Cla*I	AT/CGAT	37°C	65°C 20 นาที
*Hha*I	GCG/C	37°C	65°C 20 นาที
*Mbo*I	/GATC	37°C	65°C 20 นาที
*Mse*I	T/TAA	37°C	65°C 20 นาที
*Msp*I	C/CGG	37°C	65°C 20 นาที
*Rsa*I	GT/AC	37°C	65°C 20 นาที
*Taq*I	T/CGA	65°C	80°C 20 นาที
*Xmn*I	GAANN/NNTTC	37°C	65°C 20 นาที

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายไกรวุฒิ เกตุลอย
วัน เดือน ปีเกิด	6 ธันวาคม 2519
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมตอนปลายที่โรงเรียน ภ.ป.ร. ราชวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม ปีการศึกษา 2536 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (โรคพืช) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2540

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University