ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคสหรือเดกโตรส	20	กรัม
วุ้นผง	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีทำ

มันฝรั่งปอกเปลือกแล้วหั่นให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าเล็กๆขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชั่งน้ำหนัก 200 กรัม นำไปต้มไฟอ่อนๆ ในน้ำที่ตวงไว้ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งนิ่มใช้เวลาประมาณ 20 นาที กรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใสนำมาต้มรวมกับวุ้น 18 กรัมที่ละลายในน้ำเย็นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใช้ไม้พายกวนจนวุ้นละลายใช้เวลาประมาณ 20 นาที เมื่อวุ้นละลายหมดแล้วใส่น้ำตาลที่ชั่งไว้ 20 กรัม ลงไป คนให้น้ำตาลละลายปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร บรรจุภาชนะปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ /ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที ปล่อยให้อาหาร PDA มีอุณหภูมิประมาณ 50-60 °ซ เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วัน ให้ไอน้ำที่เกาะที่ฝาจานอาหารระเหยก่อนนำไปใช้เลี้ยงเชื้อ

2. อาหาร Potato Dextrose Broth (PDB)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB เตรียมเช่นเดียวกับวิธีเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แต่จะไม่เติมวุ้นลงในส่วนผสม

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ DNA

1. DNA extraction buffer

2 % (w/v) Cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB)

1.42 M NaCl

20 mM EDTA

100 mM Tris-HCL, pH 8.0

2 % (w/v) polyvinylpyrrolidone

5 mM citric acid

2. Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1, v/v) (100 ml)

Chloroform	96 ml
Isoamyl alcohol	4 ml

3. 1X STE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

0.1 M NaCl

10 mM Tris-HCL, pH 8.0

1 mM EDTA, pH 8.0

4. 1X TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

10 mM Tris-HCL, pH 8.0

1 mM EDTA, pH 8.0

5. 5X Tris-borate electrophoresis buffer (TBE)

Tris-base	5.4 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
0.5 M EDTA, pH 8.0	20.0 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

6. 0.5 M EDTA (pH 8.0) 500 มิลลิลิตร

ชั่งสาร Disodium ethylenediamine tetra-acetate.2H_2O (EDTA) จำนวน 186.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (distilled water) 700 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วยเกล็ด NaOH ปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร บรรจุใส่ขวด และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Ethidium bromide (10 mg/ml)

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนด้วยการใช้ magnetic stirrer จนกว่าจะละลาย เมื่อละลายดีแล้วจึงห่อขวดที่บรรจุด้วย aluminium foil

ข้อควรระวังในการเตรียม ethidium bromide ต้องสวมถุงมือระหว่างการเตรียม ระวังอย่าหายใจเอาผง ethidium bromide เข้าไประหว่างการชั่ง เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

8. 1M Tris-HCl, pH 8.0

ชั่ง Tris-base 121.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลายด้วย magnetic stirrer ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl เข้มข้น แล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

9. 1 M NaCl

ละลาย NaCl 29.2 กรัมในน้ำกลั่น แล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

11. Gel loading dye (5X), 10 ml

ผสม glycerol 5 ml, 10 X TBE buffer 1 ml, 10 % bromophenol blue 1 ml, 10 % xylene cyanol 1 ml ในน้ำกลั่น 2 ml บรรจุลงหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดละ 1 ml ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที เก็บที่ 4 °ซ

12. ชนิดบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ทั่วไปในการตรวจสอบดีเอ็นเอในสภาพปกติ (ดัดแปลงจาก Sambrook et al., 1989)

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นในการใช้งาน	ความเข้มข้นของ stock solution
Tris-acetate (TAE)	1X : 0.04 M Tris-acetate 0.001 M EDTA	50X : 242 g Tris base 57.1 ml glacial acetic acid 100 ml 0.5 M EDTA (pH8.0)
Tris-phosphate (TPE)	1X: 0.09 M Tris-phosphate 0.002 M EDTA	10X : 108 g Tris base 15.5 ml 85 % phosphoric acid (1.679 g/ml) 40 ml 0.5 M EDTA (pH8.0)
Tris-borate (TBE)	0.5X : 0.045 M Tris-borate 0.001 M EDTA	5X : 108 g Tris base 27.5 g boric acid 20 ml 0.5 M EDTA (pH8.0)

13. ชนิดของ gel loading buffer ที่นิยมใช้ผสมสารละลายดีเอ็นเอ

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นในการเตรียม	การเก็บรักษา
Buffer I (6X)	0.25 % (w/v) bromophenol blue 0.25 % (w/v) xylene cyanol FF 40 % (w/v) sucrose	เก็บรักษาไว้ที่ 4 ^{o}ซ
Buffer II (6X)	0.25 % (w/v) bromophenol blue 0.25 % (w/v) xylene cyanol FF 15 % (w/v) Ficol (Type 400; Pharmacia)	เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง
Buffer III (6X)	0.25 % (w/v) bromophenol blue 0.25 % (w/v) xylene cyanol FF 0.25 % (w/v) glycerol	เก็บรักษาไว้ที่ 4 ^{o}ซ
Buffer IV (6X)	0.25 % (w/v) bromophenol blue 40 % (w/v) sucrose	เก็บรักษาไว้ที่ 4 ^{o}ซ

วัตถุประสงค์ของการใช้ gel loading buffer คือ การเพิ่มความหนาแน่นให้กับสารละลายดีเอ็นเอ ไม่ให้กระจายออกไปจากหลุม (well) เมื่อ load บนเจล และมีสีเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกหลุมที่มีการ load ตัวอย่างแล้ว นอกจากนี้ยังเป็นตัวบ่งชี้ระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลในระหว่างที่ทำอิเล็กโตรโฟริซิส โดยเมื่อใช้ 0.5 X TBE buffer ส่วนสีของ bromophenol blue มีการเคลื่อนที่เทียบเท่ากับดีเอ็นเอสายคู่ขนาด 300 bp ส่วนสี xylene cyanol FF เคลื่อนที่ได้ช้ากว่า มีอัตราการเคลื่อนที่เทียบเท่ากับดีเอ็นเอสายคู่ขนาดประมาณ 4 kb

ภาคผนวก ค
ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ DNA ของเห็ดฟาง

14. ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ใน arbitrary primer ที่ใช้ในการเตรียมแบบแผน RAPD ของเห็ดฟาง

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5' ไปยัง 3'
A – 02	TGC CGA GCT G
A – 07	GAA ACG GGT G
A – 09	GGG TAA CGC C

ภาคผนวก ง

การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์

เพ็ญนภา โสใหญ่, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และนิวัฒ เสนาะเมือง. 2547. ลักษณะการเจริญเติบโตของเห็ดฟางที่ได้จากสปอร์เดี่ยวและเห็ดฟางลูกผสม. การสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ วันที่ 26-27 มกราคม 2547 ณ ห้องประชุม กวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น. หน้า 491-502.