ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง (ล้างผิวเปลือกให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นบาง) 200 g

Dextrose	20 g
Agar	15 g
DW	1000 ml

วิธีการเตรียมคือ ตั้งน้ำให้เดือด ต้มมันฝรั่งจนสุด (นิ่ม) ประมาณ 15 นาที ถึงครึ่งชั่วโมง แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง เติมส่วนผสมอื่น ๆ แล้วเติมน้ำจนครบ 1000 ml ต้มวุ้นจนละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาหารนี้นิยมใช้ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด

2% Agarose gel

ชั่งเจล 1.0 กรัม ผสมกับ 1X TAE Buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ หลอมให้เจลละลายหมดด้วยเครื่องไมโครเวฟ จนสังเกตเห็นเจลใสเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีเม็ดเจลปนอยู่

สีย้อม lactophenol cotton blue (HIMEDIA, India)

สารละลาย A

Lactic acid	20 ml
Phenol (melted crystal)	20 ml
Glycerol	40 ml
Distilled water (DW)	20 ml

สารละลาย B

Cotton blue	0.05 g

วิธีการเตรียม

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ละลาย phenol (หลอม phenol แล้วดูดมา 20 ml) ลงใน lactic acid, glycerol และน้ำกลั่น โดยผ่านความร้อนอ่อน ๆ เติม cotton blue ลงไป (สำหรับ cotton blue อาจเตรียมเป็น 1% แล้วใช้ผสมในปริมาณ 2 ml ต่อสูตรที่เตรียมข้างบน)

70% Alcohol

ตวง 95% Alcohol ปริมาตร 750 ml ผสมลงไปในน้ำกลั่น 250 ml

TAE buffer (1x)

ปิเปต TAE buffer (50x) ปริมาตร 20 ml ผสมลงในในน้ำกลั่น 1,000 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

TE buffer

เตรียมโดยละลาย Tris 1.211 กรัม และ EDTA 9.306 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionize water) ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 0. 01 M HCl ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เตรียม Working Primer ที่ความเข้มข้น 10 μM

เตรียมจาก Stock Primer ที่ความเข้มข้น 100 μM

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

(ความเข้มข้นของสาร1)(ปริมาตรของสาร1) = (ความเข้มข้นของสาร2)(ปริมาตรของสาร2)

$(100\ \mu M)(V_1) = (10\ \mu M)(500\ \mu l)$

$V_1 = 50\ \mu l$

ดังนั้น ปิเปต Stock Primer ที่ความเข้มข้น 100 μM ปริมาตร 50 μl ผสมน้ำกลั่น PCR ปริมาตร 450 μl

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี