



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยพระรัตน



ภาคผนวก ก

สารละลายและบัฟเฟอร์

1. 10X Tris borate buffer (10X TBE buffer)

1.1	Tris base	108	g
1.2	boric acid	55	g
1.3	0.5 mM EDTA pH 8.0	40	ml

ละลายสารในข้อ 1.1 และ 1.2 โดยน้ำกลั่นจากนั้นผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml ก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาทีแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Loading buffer

2.1	0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) bromophenol blue
2.2	0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) xylene cyanol FF
2.3	40 เปอร์เซ็นต์ (w/v) sucrose

ผสมสารทั้งสามตัวเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ตามต้องการก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3. TE buffer (Tris-EDTA buffer)

3.1	10 mM Tris-HCl
3.2	1 mM EDTA

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

4. Ethidium bromide 10 mg/ml

ชั่ง Ethidium bromide 1 g นำไปละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนด้วย magnetic stirrer

จนกระทั่งสารละลายละลายหมดซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C ในการเตรียมสารนี้ต้องใช้ความระมัดระวังอย่างมาก โดยสวมถุงมือและอย่าหายใจเอาผงของ Ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

5. 40 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide (19:1)

5.1 acrylamide 38 g

5.2 bis-acrylamide 2 g

ซึ่งสารแต่ละชนิด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C มีข้อควรระวังในการเตรียมสารละลาย polyacrylamide คือสารนี้เป็นอันตรายต่อระบบประสาท (neurotoxin) ทั้งที่ยังเป็นผง และเมื่อเป็นสารละลาย ในการเตรียมทุกครั้งควรใช้ผ้าปิดจมูกและสวมถุงมือ

6. 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide

6.1 40 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide 15 ml

6.2 7 M Urea 42 ml

6.3 5X TBE 20 ml

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 100 ml แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C ควรสวมถุงมือทุกครั้งที่ได้เตรียมสารละลาย

7. 10 เปอร์เซ็นต์ ammonium persulfate (APS)

ซึ่ง APS 1 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

8. 0.5 เปอร์เซ็นต์ acetic acid / 95 เปอร์เซ็นต์ ethyl alcohol (EtOH)

8.1 acetic acid 0.250 ml

8.2 ปรับปริมาตรด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ EtOH ให้ได้ปริมาตร 50 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

9. Fix / Stop solution

9.1 acetic acid 50 ml

9.2 ultra pure water 450 ml

10. Silver straining solution

- | | | | |
|------|---|------|----|
| 10.1 | silver nitrate ($\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$) | 0.5 | g |
| 10.2 | 37 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde | 0.75 | ml |

ปรับปริมาตรด้วย ultra pure water ให้ได้ 500 ml เก็บไว้ในที่มืด และควรเตรียมใหม่ทุก
ครั้งก่อนใช้

11. Developer solution

- | | | | |
|------|--|------|-------|
| 11.1 | sodium carbonate(Na_2CO_3) | 15 | g |
| 11.2 | 37 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde | 0.75 | ml |
| 11.3 | sodium thiosulfate | 1-2 | เกล็ด |

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 500 ml แช่เย็นให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 10°C
และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้





ภาคผนวก ข

สูตรอาหาร

ตาราง 15 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KN_2PO_4	170
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.830
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
H_3BO_3	6.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.25
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCL	0.5
Thiamine-HCL	0.1
Sucrose	30000
Myo-inositol	100

ตาราง 16 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารในอาหารสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม/ลิตร)
NH_4NO_3	1,650	16.50
KNO_3	1,900	19.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	440	4.40
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3.70
KH_2PQ_4	170	1.70

ตาราง 17 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารในอาหารสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม/ลิตร)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	25
KI	0.830	830
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600	8600
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.300	22,300
H_3BO_3	6.200	6200
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250	250
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	25

ตาราง 18 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของวิตามินในอาหารสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารในอาหารสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม/ลิตร)
Glycine	2.00	2000
Thiamine-HCL	0.25	250
Pyridoxine-HCL	0.25	250
Nicotinic acid	0.25	250

ตาราง 19 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของเหล็กในอาหารสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารในอาหารสูตร MS (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม/ลิตร)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.85	2,785
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.25	3,725

ตาราง 20 ปริมาตรของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร MS (1962)

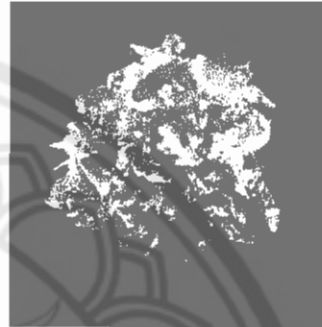
ชนิดของสารละลาย	ปริมาตรของสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
10X Macro	100
100X Micro	10
100X Vitamin	10
100X FeNaEDTA	10
Myo-Inositol	100 mg/l
Hormone	*
Agar	8 g / l
Sucrose	30 l

* ชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช



ภาคผนวก ค

แสดงลักษณะดอกของปทุมมา ลิลีและหน้าวัว



(ก) ช่อดอกย่อย (f)

(ข) ต้นที่มีลักษณะคล้ายยอด (retarded shoot)

ภาพ 33 แสดงเนื้อเยื่อปทุมมาที่ใช้ในการทดลอง

(ก) ช่อดอกย่อย

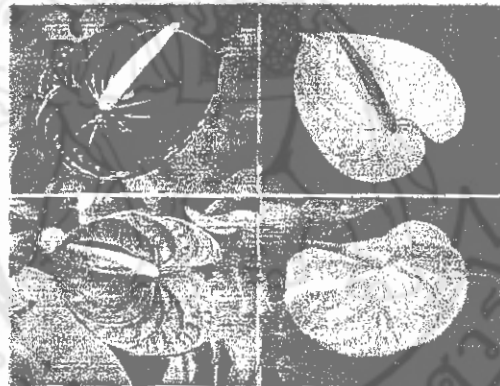
(ข) ต้นที่มีลักษณะคล้ายยอด



ภาพ 34 แสดงลักษณะดอกของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep)
ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพ 35 แสดงลักษณะดอกของลิลลี่ (*Lilium speciosum*)

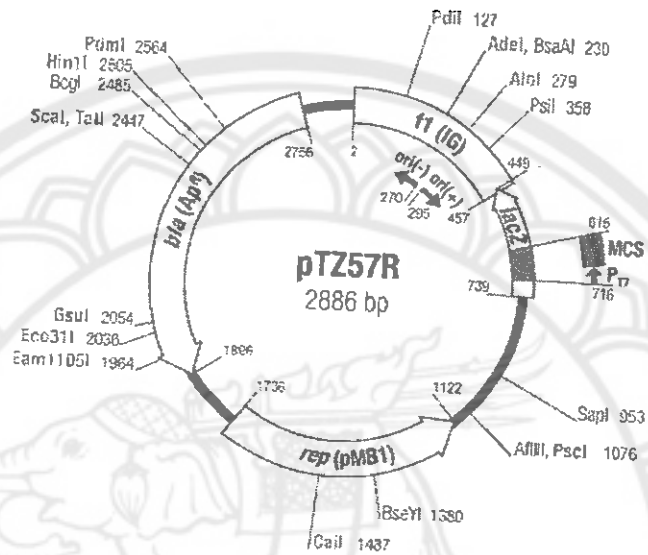


ภาพ 36 แสดงลักษณะดอกของหน้าวัว (*Anthurium Andraeanum*)

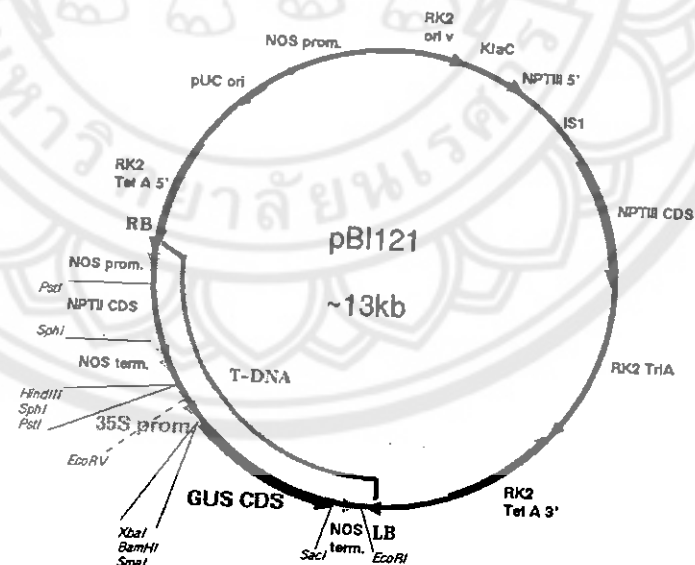


ภาคผนวก ง

แผนที่พลาสมิด



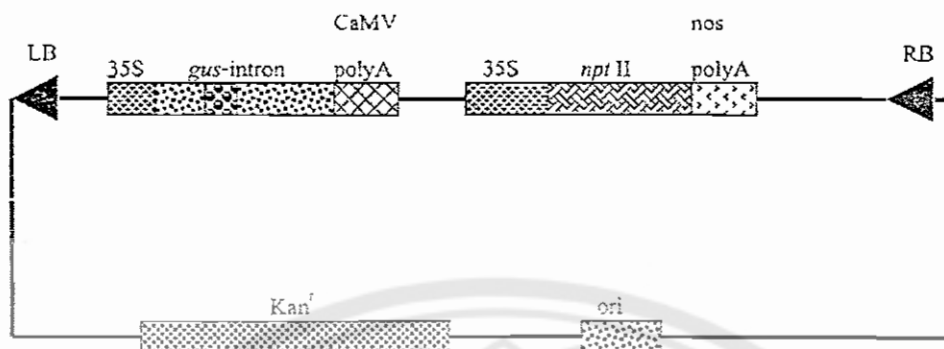
ภาพ 37 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pTZ57R



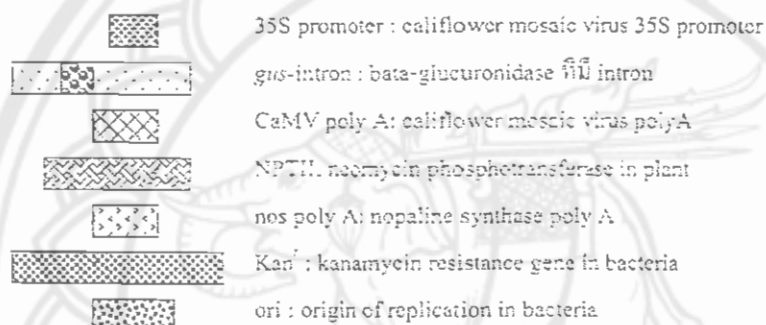
GUS fusion junction:

AAG CTT GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG GGT
 GGT CAG TCC CTT ATG TTA...

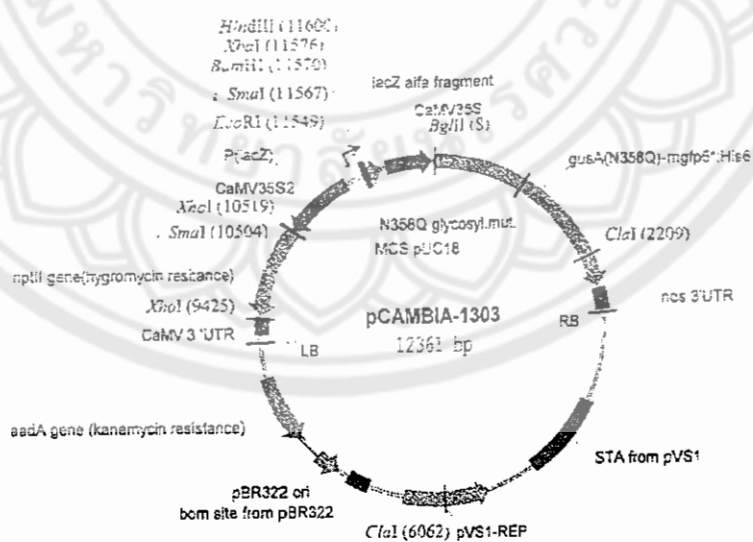
ภาพ 38 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pBI121



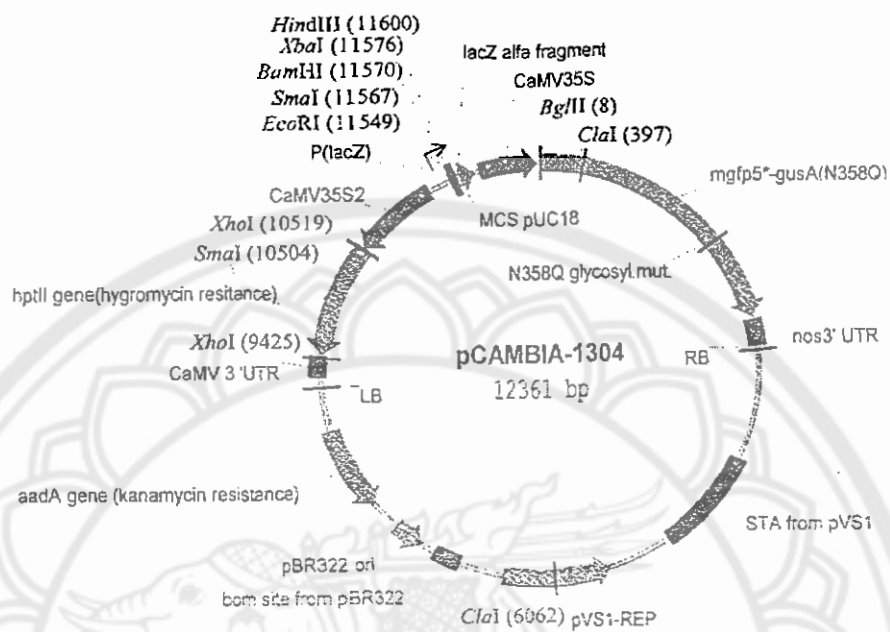
รูป 73 แสดงแผนที่พลาสมิด pSCV1.6 ขนาดประมาณ 13 kb



ภาพ 39 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pSCV1.6



ภาพ 40 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pCambia1303



ภาพ 41 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pCambia1304