ภาคผนวก

1. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา** Potato Dextrose Agar (PDA)

ละลาย PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50– 60 °C ก่อนเทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

2. **การเตรียมอาหารเหลว** (Henninger) **เลี้ยงเชื้อรา** *P. palmivora*

ชั่ง 0.5 KH_2PO_4 ,0.25 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 กรัม Asparagine, 1 มิลลิกรัม thiamine, 0.5 กรัม yeast extract และ 25 กรัม glucose นำสารทั้งหมดละลายในน้ำ 1 ลิตร แล้วแบ่งใส่ขวด duran ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เทใส่ขวดละ 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป autoclave ที่ 121 °C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลง ก่อนตัดชิ้นเชื้อรา *P. palmivora* ลงในอาหาร

3. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา** V_8

นำ V_8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับ แคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 3 กรัม เติมผงวุ้น 20 กรัม ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 °C และเทใส่จานแก้วปราศจากเชื้อเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 มิลลิลิตร

4. **การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด**

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัมใน 95% ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 85% phosphoric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร กรองก่อนนำไปใช้

5. **การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด**

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

6. **การเตรียมบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ** Tris-Tricine (Tris-Tricine sample buffer)

เตรียมบัฟเฟอร์ตัวอย่างโดยการใช้ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 ผสม Glycerol 2.4 มิลลิลิตร, 10% SDS 1 มิลลิลิตร, β-mercaptoethanol 0.2 มิลลิลิตร และ 0.5% Coomassie brilliant blue G-250 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร สุดท้ายปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร โดยการใช้น้ำกลั่นปลอดไอออน (deionized water) 4 มิลลิลิตร

7. **การเตรียมสารตัวอย่าง** Tricine-SDS-PAGE

โดยการนำสารตัวอย่าง 3 ส่วนผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วนที่ได้จากการเตรียมในข้อ 6 จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของโปรตีนตามที่ต้องการ ก่อนทำอิเล็กโทรฟอรีซิสต้องนำสารตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที

8. **การเตรียมโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ** (low molecular weight)

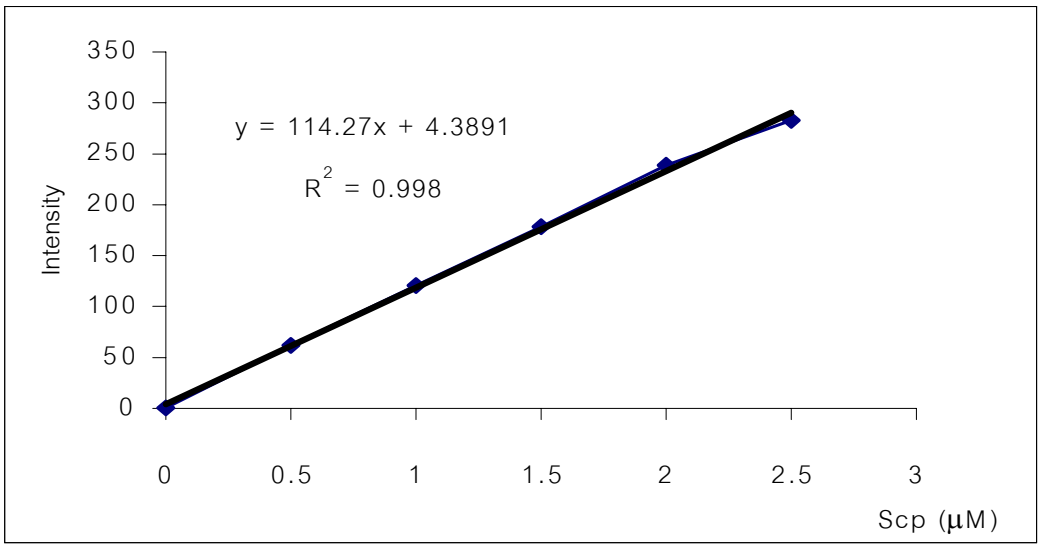
นำโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำมาเจือจางกับ Tris-Tricine sample buffer ในอัตราส่วน 1:20 ต่อมานำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปใช้ครั้งละ 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่องเจล

9. **การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน** (BSA)

ละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) จำนวน 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, และ 25 ไมโครกรัม ต่อ 100 ไมโครลิตร

10. **การเตรียมสคอพอลิตินมาตรฐาน**

ละลายสคอพอลิติน (Scp) จำนวน 96.1 มิลลิกรัม ใน 95% เอทานอล 10 มิลลิลิตร จะได้สคอพอลิตินที่มีความเข้มข้น 50 mM จากนั้นเจือจางสารละลายสคอพอลิตินแบบ serial dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสคอพอลิตินเท่ากับ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 μM ตามลำดับ แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofruorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน (Scp) (ไฟโตอเล็กซินที่พบในใบยางพารา) กราฟมาตรฐานสคอพอลิติน โดยใช้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินเป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 μM อ่านค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร (λ excitation) และความยาวปลดปล่อย 440 นาโนเมตร (λ emission) ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน



กราฟมาตรฐานสคอพอลิติน โดยใช้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 μM อ่านค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร (λ excitation) และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน

11. การเตรียมลามินาริน

ละลายลามินารินจำนวน 0.1 กรัมใน 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จะได้สารสับสเตรตที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

12. การเตรียมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย DNS 5 กรัมใน 2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายโซเดียมโปตัสเซียมทาร์เตรต (จำนวน 150 กรัมซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร) ลงไปในขณะที่ยังร้อนอยู่คนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง (Burner, R. L. 1964)

13. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ละลายน้ำตาลกลูโคสจำนวน 1.94 กรัมใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ 0.1 M ของน้ำตาลกลูโคส หลังจากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ไมโครโมลต่อ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ นำ 100 ไมโครลิตรของแต่ละความเข้มข้นไปเติมสารละลาย DNS 0.2 มิลลิลิตร และ 0.1 M โซเดียมอะซิเตต pH 5.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที เติมน้ำกลั่นอีก 0.9 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวพันธ์วศรี แสงสุวรรณ

วัน เดือน ปี เกิด 26 ตุลาคม 2520

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (วิทยาเขตหาดใหญ่)	2543