ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA)

นำ PDA ปริมาณ 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส และเทใส่จานแก้วปราศจากเชื้อเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 มิลลิลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Broth (PDB)

นำ PDB ปริมาณ 24 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เทใส่ขวดเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการ autoclave แล้ว ขวดละ 150 มิลลิลิตร

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา V_8

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

4. 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

5. การเตรียมสารตัวอย่าง Tricine-SDS-PAGE

โดยการนำสารตัวอย่าง 3 ส่วนผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วนที่ได้จากการเตรียมในข้อ 4 จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของโปรตีนตามที่ต้องการ ก่อนทำอิเล็กโทรฟอรีซิสต้องนำสารตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที

6. การเตรียมโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (low molecular weight)

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

7. การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

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

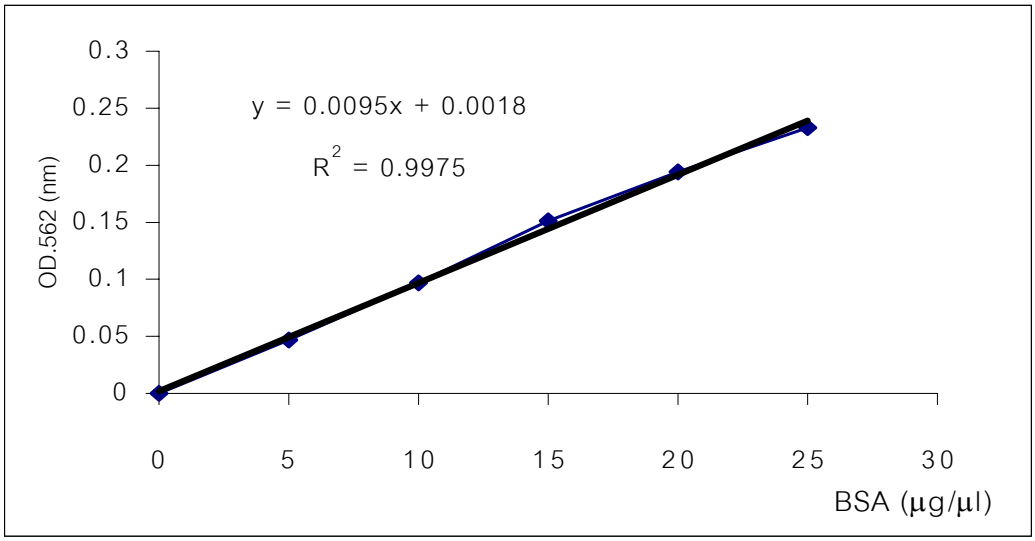
8. การเตรียมสารละลาย C

ผสมสารละลาย A (1% (w/v) BCA-Na_2, 2% (w/v) sodium carbonate, 0.16% (w/v) sodium tartrate, 0.4%(w/v) sodium hydroxide และ 0.95% (w/v) sodium bicarbonate) 100 ส่วน ผสมกับสารละลาย B (4% (w/v) $Cuso_4.5H_2O$) 2 ส่วน สารละลาย C ที่ได้จะมีสีเขียวและมีความเสถียรไม่เกิน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง (Smith *et al*., 1985)

9. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีใช้กรดไบซินโคนินิค

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Smith และคณะ (1985) โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลาย C ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ

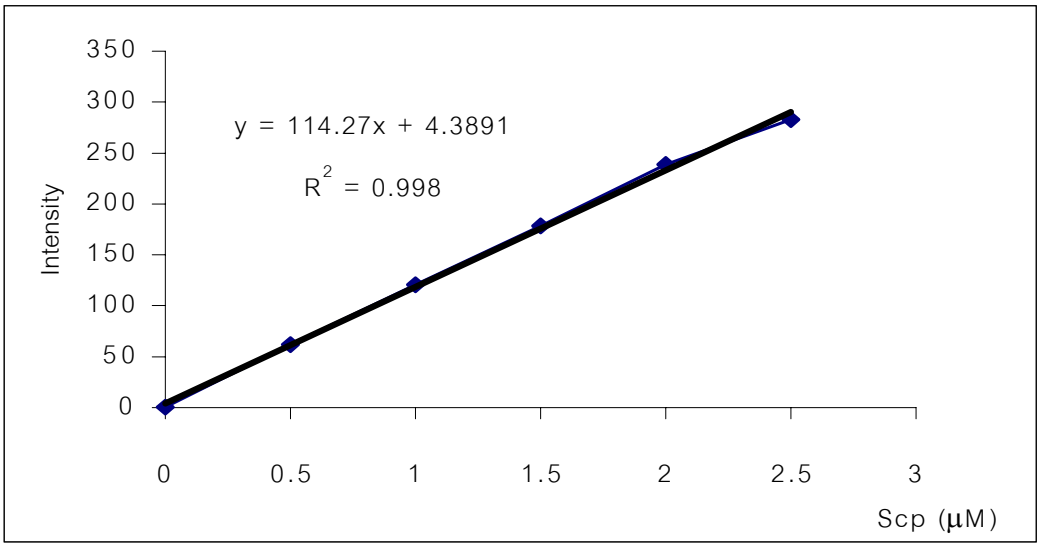


กราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA) โดยใช้ปริมาณของโปรตีน BSA เป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร

10. การเตรียมสคอพอลิตินมาตรฐาน

ละลายสคอพอลิติน จำนวน 96.1 มิลลิกรัมใน 95% เอทานอล 10 มิลลิลิตร จะได้สคอพอลิตินที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการเจือจางสารละลายสคอพอลิตินแบบ serial dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสคอพอลิตินเท่ากับ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofruorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตรและความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน (Scp) (ไฟโตอเล็กซินที่พบในใบยางพารา)กราฟมาตรฐานสคอพอลิตินโดยใช้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินเป็น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 ไมโครโมลาร์ 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 ไมโครโมลาร์ อ่านค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร (λ excitation) และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน