



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก ก

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Peptone (Merk , germany)
Bacto Yeast extract (Difco, USA)
Sodium chloride (Promega, USA)
Bacto Agar (Difco, USA)

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดแบคทีเรีย

Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)
Tris-HCl
Sodium hydroxide (NaOH)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)
Potassium acetate
Isopropanol
Ethanol

3. สารเคมีในการฟอกน้ำเชื้อและสารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับพืช

70% และ 95% ethanol
Clorox
Tween-20
MS สำเร็จรูป (Murashige & skoog modified basal medium)
Sucrose
Agar
Acetosyringone
Casamino acid
L- proline

L- glutamine

L- aspartic acid

KCl

MgSO₄.6H₂O

H₃BO₄

ZnSO₄.7H₂O

Na₂MoO₄.2H₂O

CuSO₄.5H₂O

CoCl₂.6H₂O

CaCl₂. 2H₂O

MgSO₄.7H₂O

Fe-EDTA

NaH₂PO₄.2H₂O

Nicotinic acid

Thiamine hydrochloride

Pyridoxine monohydrochloride

Myo-inositol

4. สอรัโมนพืช

NAA

BA

2,4-D

TDZ

Kinetin

5. ยาปฏิชีวนะ

Kanamycin (Bio basic INC, Canada)

Rifampicin (Bio basic INC, Canada)

Cefotaxime (Siam Bheasach Co., Ltd., Bangkok Thailand)

4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดจีโนมพืช

Liquid nitrogen

Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)

Tris-HCl

PVPP

Hexadecylmethylammonium bromide (CTAB)

β - mercaptoethanol

Chloroform

Isopropanol

Ethanol

RNase A

5. สารเคมีที่ใช้เตรียมเจลและบัฟเฟอร์

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-base)

Boric acid

Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)

Agarose (Promega, USA)

Agar

Ethidium bromide

Bromophenol blue

Xylene cyanol

Sucrose

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายและสูตรอาหาร

LB (Luria-Bertani) Broth

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml

LB-S

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
Agar	15 g
Kanamycin	50 mg
Rifampicin	50 mg

หมายเหตุ กรณีอาหารเหลวไม่ต้องเติม Agar

DNA extraction Buffer

DNA extraction buffer	stock	5 ml
1.4 M NaCl	5.0 M	1.40 ml
20 mM EDTA	1.5 M	0.20 ml
100 mM Tris-HCl	2.0 M	0.25 ml
1% PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone)		0.05 g
4% CTAB	10 %	2.00 ml

Distilled H ₂ O (autoclaved)		1.0 ml
---	--	--------

0.1% β-mercaptothiophenol	100%	5.0 μl
---------------------------	------	--------

BP1

2.0 M Tris-HCl		250 μl
----------------	--	--------

0.5 M EDTA		200 μl
------------	--	--------

Distilled H ₂ O (autoclaved)	to	10 ml
---	----	-------

BP2

10 M NaOH		200 μl
-----------	--	--------

20% SDS		500 μl
---------	--	--------

Distilled H ₂ O (autoclaved)	to	10 ml
---	----	-------

BP3

4 M Potassium acetate		
-----------------------	--	--

TAS (Co-culture medium for tobacco)

MS สำเร็จรูป (Murashige & Skoog modified basal medium)		4.44 g
--	--	--------

Sucrose		30 g
---------	--	------

NAA		0.1 mg
-----	--	--------

BA		1 mg
----	--	------

Agar		8 g
------	--	-----

Distilled H ₂ O (autoclaved)	to	1000 ml
---	----	---------

100 μM Acetosyringone		1 ml
-----------------------	--	------

pH 5.8

หมายเหตุ กรณีอาหารเหลวไม่ต้องเติม Agar

TSM (Selective medium for tobacco)

MS สำเร็จรูป (Murashige & Skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
NAA	0.1 mg
BA	1 mg
Agar	8 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	1000 ml
Kanamycin	100 mg
Cefotaxime	500 mg
pH 5.8	

TRM (Regeneration medium for tobacco)

MS สำเร็จรูป (Murashige & Skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
NAA	0.1 mg
Distilled H ₂ O (autoclaved)	1000 ml
Kanamycin	50 mg
Cefotaxime	400 mg
pH 5.8	

PAS (Co-culture medium for petunia)

MS สำเร็จรูป (Murashige & Skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
NAA	0.01 mg
BA	2 mg
Agar	8 g

Distilled H ₂ O (autoclaved)	to	1000 ml
100 µM Acetosyringone		1 ml
pH 5.8		
หมายเหตุ กรณีอาหารเหลวไม่ต้องเติม Agar		

PSM (Selective medium for petunia)

MS สำเร็จรูป (Murashige & Skoog modified basal medium)		4.44 g
Sucrose		30 g
NAA		0.01 mg
BA		2 mg
Agar		8 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to	1000 ml
Kanamycin		100 mg
Cefotaxime		500 mg
pH 5.8		

TRM (Regeneration medium for petunia)

MS สำเร็จรูป (Murashige & Skoog modified basal medium)		4.44 g
Sucrose		30 g
NAA		0.01 mg
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to	1000 ml
Kanamycin		50 mg
Cefotaxime		400 mg
pH 5.8		

MS-TDZ (shoot induction medium for rice)

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
TDZ	4 mg
Agar	8 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
pH 5.8	

MS-TDZ-AS (Co-culture medium for shoot of rice)

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
TDZ	4 mg
Agar	8 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
100 µM Acetosyringone	1 ml
pH 5.8	

หมายเหตุ กรณีอาหารเหลวไม่ต้องเติม Agar

MS-TDZ-S (Selective medium for shoot of rice)

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
TDZ	4 mg
Agar	8 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
Kanamycin	100 mg
Cefotaxime	500 mg
pH 5.8	

MS-TDZ-R (Regeneration medium for shoot of rice)

MS ตำรื้อรูป (Murashige & Skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
Casamino acid	300 mg
L-proline	500 mg
Kinetin	1 mg
NAA	0.1 mg
TDZ	4 mg
Kanamycin	50 mg
Cefotaxime	400 mg
Agar	8 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	1000 ml
pH 5.8	

N6D (Induction callus medium)

N6 ตำรื้อรูป (C167 Chu's N6 Medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
2,4 D	2 mg
Casamino acid	300 mg
L-proline	2,878 mg
Myo-inositol	100 mg
Kelcogel (gellan gum)	4 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	1000 ml
pH 5.8	

REK medium (Regeneration medium for kitaake rice)

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
Casamino acid	2 g
Myo-inositol	100 mg
Sorbitol	30 g
NAA	0.02 mg
Kinetin	2 mg
Kelcogel (gellan gum)	4 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
pH 5.8	

MSD (Induction callus medium) 1 L

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
Kelcogel (gellan gum)	4 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
pH 5.8	

MSD-AS (Co-culture medium for callus of rice) 1 L

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
2,4-D	4 mg
Kelcogel (gellan gum)	4 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
100 μ M Acetosyringone	1 ml
pH 5.8	

MSD-S (Selective medium for callus of rice) 1 L

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Sucrose	30 g
2,4-D	4 mg
Kelcogel (gellan gum)	4 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	1000 ml
Kanamycin	150 mg
Cefotaxime	500 mg
pH 5.8	

RE1 medium (ดัดแปลงจาก Samiphak and Siwarungson, 2006)

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Casamino acid	300 mg
Yeast extract	100 mg
L-proline	500 mg
L-glutamine	500 mg
Sucrose	30 g
BA	4 mg
Phytigel	6 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	1000 ml
pH 5.8	

RE2 medium (ดัดแปลงจาก Zaidi *et al*, 2006)

MS ตำเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
Casamino acid	1 g
Kinetin	2 mg

IAA	1 mg
BA	2 mg
Sucrose	30 g
Agar	10 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
pH 5.8	

RE3 medium (ดัดแปลงจาก Lin and Zhang,2005)

MS ต้ําเร็จรูป (Murashige& skoog modified basal medium)	4.44 g
L-glutamine	300 mg
L-proline	500 mg
2,4-D	2.5 mg
Sucrose	30 g
Phytigel	3 g
Distilled H ₂ O (autoclaved)	to 1000 ml
pH 5.8	

AAM medium

AA-1	1 ml
AA-2	1 ml
AA-3	1 ml
AA-4	1 ml
AA-5	1 ml
AA-6	1 ml
AA- solution	10 ml
Casamino acid	0.5 g
L- glutamine	0.9 g

L- aspartic acid 0.3 g
 KCl 3 g
 pH 5.2

Stock AA-1 (1000X) 100 ml

MgSO₄·6H₂O 1 g
 H₃BO₄ 0.3 g
 ZnSO₄·7H₂O 0.2 g
 Na₂MoO₄·2H₂O 25 mg
 CuSO₄·5H₂O 2.5 mg
 CoCl₂·6H₂O 2.5 mg
 KI 75 mg

Stock AA-2 (1000X) 100 ml

CaCl₂· 2H₂O 15 g

Stock AA-3 (1000X) 100 ml

MgSO₄·7H₂O 25 g

Stock AA-4 (1000X) 100 ml

Fe-EDTA 4 g

Stock AA-5 (1000X) 100 ml

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15 g
---	------

Stock AA-6 (1000X) 100 ml

Nicotinic acid	20 mg
----------------	-------

Thiamine hydrochloride	200 mg
------------------------	--------

Pyridoxine monohydrochloride	20 mg
------------------------------	-------

Myo-inositol	2 g
--------------	-----

Stock AA solution (1000X) 100 ml

L-Arginine	1.77 g
------------	--------

Glycine	95 mg
---------	-------

GUS: Histochemical Staining with X-Gluc**Gus buffer 1 ml**

1 M NaPO_4 pH 7.0	100 μl
----------------------------	-------------------

0.5 M EDTA	20 μl
------------	------------------

10% Triton X-100	10 μl
------------------	------------------

50mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	20 μl
---	------------------

0.1M X-Gluc	20 μl
-------------	------------------

H_2O	830 μl
----------------------	-------------------

50mM FerriCyanide $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 ml

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	82.3 mg
------------------------------------	---------

H_2O	to	5 ml
----------------------	----	------

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

0.1M X-Gluc 1 ml

X-Gluc	50 mg
N,N-Dimethylformamide (N,N-DMF)	1 ml
เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	

DNA extraction Buffer

DNA extraction buffer	Stock	5 ml
1.4 M NaCl	5.0 M	1.40 ml
20 mM EDTA	1.5 M	0.20 ml
100 mM Tris-HCl	2.0 M	0.25 ml
1% PVPP		0.05 g
4% CTAB	10%	2 ml
Distilled H ₂ O (autoclaved)		1 ml
0.1% β -mercaptophenol	100%	5 μ l

ผสมสารให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 นาที และ
เติม β -mercaptophenol ก่อนนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล

นางสาวบุปผา วุฒิเพย

วัน เดือน ปี เกิด

8 กันยายน 2528

การศึกษา

สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย ณ

โรงเรียนแม่อนวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ 2546

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

จังหวัดเชียงใหม่ 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved