

ภาคผนวก ก

การเตรียม buffer และสารละลายเข้มข้น

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

1.1	Tris base	108	กรัม
1.2	boric acid	55	กรัม
1.3	0.5 มิลลิโมล EDTA pH 8.0	40	มิลลิลิตร

ละลายสารในข้อ 1.1 และ 1.2 โดยน้ำกลั่นจากนั้นผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Loading buffer

2.1	Bromophenol blue 0.25% (w/v)
2.2	Xylene cyanol FF 0.25% (w/v)
2.3	Sucrose 40% (w/v)

ผสมสารทั้งสามตัวเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ตามต้องการก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. TE buffer (Tris-EDTA buffer)

3.1	Tris-HCl 10 mM
3.2	EDTA 1 mM

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. Ethidium bromide 10 mg/ml

ชั่ง Ethidium bromide 1 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กวนด้วย เมกนาติกลสเตอโร จนกระทั่งสารละลายละลายหมดซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการเตรียมสารนี้ต้องใช้ความระมัดระวังอย่างมาก โดยสวมถุงมือ และอย่าหายใจเอาผงของ Ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

5. 40 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide (19:1)

5.1	acrylamide	38	กรัม
5.2	bis-acrylamide	2	กรัม

ชั่งสารแต่ละชนิด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีข้อควรระวังในการเตรียมสารละลาย polyacrylamide คือ สารนี้เป็นอันตรายต่อระบบประสาท (neurotoxin) ทั้งที่ยังเป็นผง และเมื่อเป็นสารละลาย ในการเตรียมทุกครั้งควรใช้ผ้าปิดจมูก และสวมถุงมือ

6. 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide

6.1	40 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide	15	มิลลิลิตร
6.2	7 โมล Urea	42	มิลลิลิตร
6.3	5X TBE	20	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควรสวมถุงมือทุกครั้งเตรียมสารละลาย

7. 10 เปอร์เซ็นต์ ammonium persulfate (APS)

ชั่ง APS 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

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

8.1	acetic acid	0.250	มิลลิลิตร
8.2	ปรับปริมาตรด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ EtOH ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร		เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. Fix / Stop solution

9.1	acetic acid	50	มิลลิลิตร
9.2	ultra pure water	450	มิลลิลิตร

10. Silver straining solution

10.1	silver nitrate ($\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$)	0.5	กรัม
10.2	37 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde	0.75	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย ultra pure water ให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

11. Developer solution

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

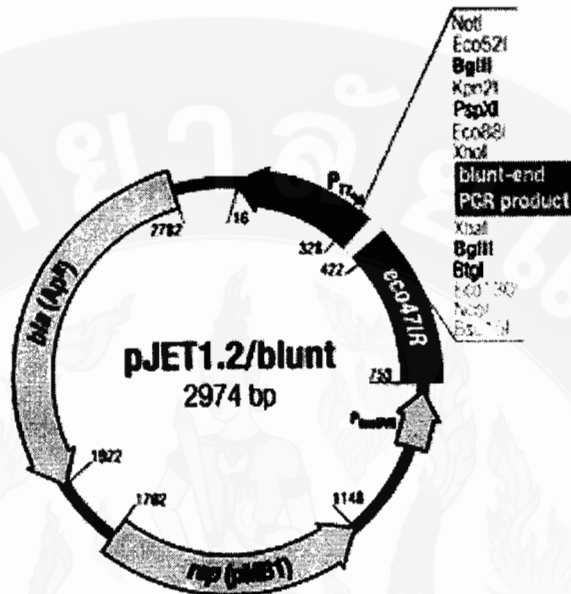
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 500 มิลลิลิตร แช่เย็นให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้



ภาคผนวก ข

Vector ที่ใช้ในการทดลองคือ pJET[®] 1.2/Blunt

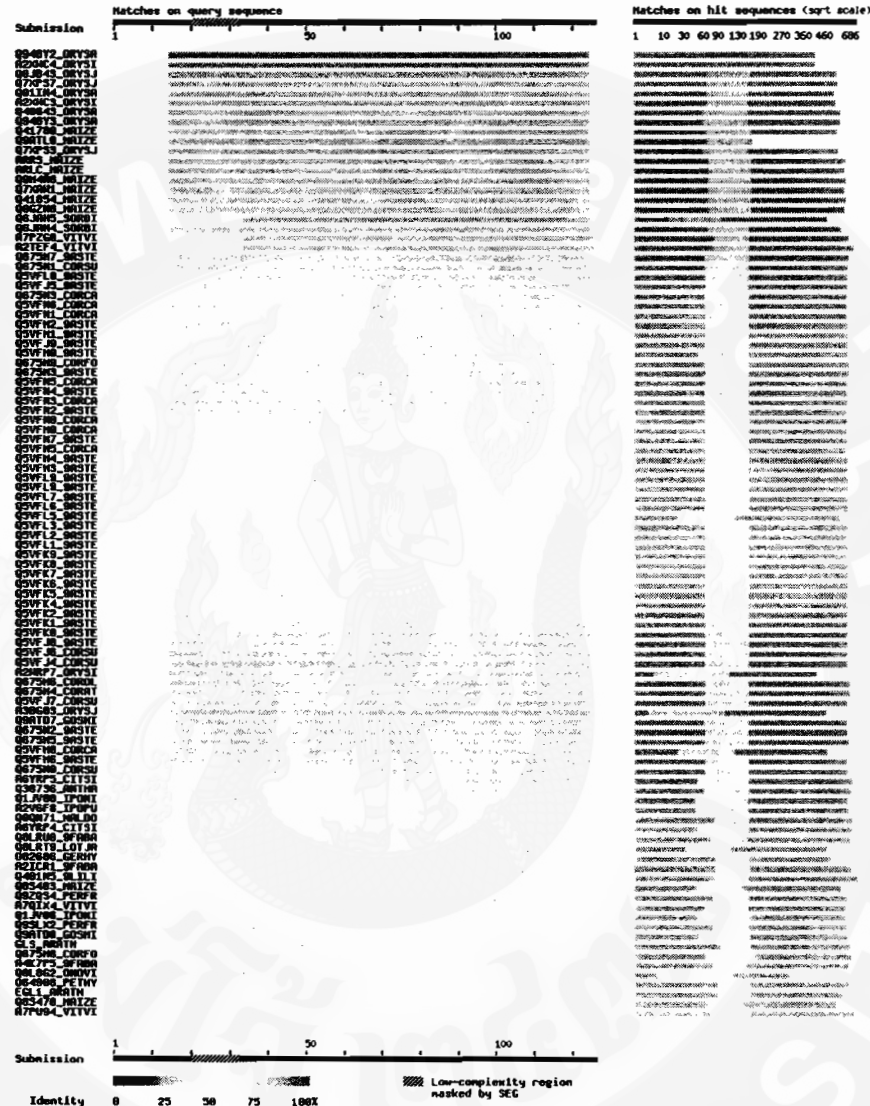
Map of pJET[®] 1.2/Blunt



The sequence of pJET[®] 1.2/Blunt

ภาคผนวก ค

การเปรียบเทียบ (Alignment) ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ transcription factor gene MYC (bHLH) (fragment ขนาดประมาณ 400 คู่เบส) จากอัญชัน และจากพืชปืชีส์อื่น ๆ ที่รายงานใน Genbank



ภาพ: แสดง Alignment ระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ transcription factor gene MYC (bHLH) จากอัญชัน และจากพืชปืชีส์อื่น ๆ ที่รายงานใน Genbank

Q82686_GERHY

Putative MYC1 protein [gmyc1] [Gerbera hybrid cv. 'Terra Regina'] 533 AA

Score = 128 bits (322), Expect = 8e-29

Identities = 55/89 (61%), Positives = 71/89 (79%)

Query: Putative *Myc* gene of *Clitoria ternatea*Sbjct: *gmyc1* gene of *Gerbera hybrid cv.*

Query: 37 DHRARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSKT 96

+ + R+P AALSPED+ DTEWY++VCM+ F GQGLPGR+ A N + WLCNA ADSK

Sbjct: 91 EQQTRRPAAALSPEDLTDTEWYFLVCMTEFTKGQGLPGRTLAKNTASWLCNAHFADSKV 150

Query: 97 FLRALLAKSASIQTIIVCIPFMSGVLELGL 125

F R+LLAKSASIQ+VC P++ G++E G+

Sbjct: 151 FSRLLAKSASIQTVVCFPYLEGIVEFGI 179

Q9FN69_GL3_ARATH

Transcription factor GLABRA 3 (Basic helix-loop-helix protein 1)**(bHLH 1) (AtbHLH001) (AtMyc-6) (Protein SHAPESHIFTER)****[GL3] [Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)] 637 AA**

Score = 123 bits (309), Expect = 3e-27

Identities = 51/84 (60%), Positives = 70/84 (83%)

Query: Putative *Myc* gene of *Clitoria ternatea*Sbjct: *AtMyc-6* gene of *Arabidopsis thaliana*

Query: 41 RKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSKTFLRA 100

R AALSPED+ADTEWYY+VCM++ F G+G+PGR++A+ +WLCNA +ADSK F R+

Sbjct: 104 RASAAALSPEDLADTEWYYLVCMSEFVNIGGMPGRTFANGAPIWLCNAHTADSKVFSRS 163

Query: 101 LLAKSASIQTIIVCIPFMSGVLELG 124

LLAKSA+++T+VC PF+ GV+E+G

Sbjct: 164 LLAKSAAVKTVVCFPLGGVVEIG 187

A4K7P5_9FABA

Myc-like anthocyanin regulatory protein [Caragana jubata] 633 AA

Score = 122 bits (306), Expect = 6e-27

Identities = 53/86 (61%), Positives = 68/86 (79%)

Query: Putative *Myc* gene of *Clitoria ternatea*Sbjct: *Myc* gene of *Caragana jubata*

Query: 39 RARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSKTFL 98

+ ++F A+LSPED+ DTEWYY+VCM++ F GQGLPGR+ + + +WLCNA +ADSK F R+

Sbjct: 87 QTKRPSASLSPEDLTDTEWYYLVCMSEFVNMGQGLPGRALVNGQPIWLINADSTDCKVFS 146

Query: 99 RALLAKSASIQTIIVCIPFMSGVLELG 124

R+LLAKSASIQ+VC PF+ GV+E+G

Sbjct: 147 RLLAKSASIQTVVCFPFMKGVLELG 172

A2TEF4_VITVI

Myc anthocyanin regulatory protein [MYC1] [Vitis vinifera (Grape)] 659 AA

Score = 137 bits (344), Expect = 2e-31

Identities = 59/92 (64%), Positives = 78/92 (84%)

Query: Putative *Myc* gene of *Clitoria ternatea*

Sbjct: *MycA1 gene of Vitis vinifera*

Query: 34 GEC DHRARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSAD 93
 GE D ++++P AALSPED++D EWYY+VCM++ F PG+GLPGR+ A+ +S+WLC+AQ AD
 Sbjct: 89 GETDQQSKRPSAALSPEDLSDAEWYYLVCMSEFVFNPGGLPGRALANGQSIWLCDAQYAD 148

Query: 94 SKTFLRALLAKSASIQTIVCIPFMSGVLELGL 125
 SK F R+LLAKSASIQT+VC P M GV+ELG+
 Sbjct: 149 SKVFSRSLAKSASIQTVVCFPHMGGVIELGV 180

Q8LRU0_9FABA

Myc-like regulatory protein [Lotus uliginosus]637 AA

Score = 128 bits (322), Expect = 8e-29
 Identities = 55/91 (60%), Positives = 74/91 (81%)

Query: Putative *Myc* gene of *Clitoria ternatea*

Sbjct: *Myc* gene of *Lotus uliginosus*

Query: 34 GEC DHRARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSAD 93
 GE D +A++P A+LSPED++D+EWYY+VCM++ F P Q LPG++ +VWLCNAQ AD
 Sbjct: 80 GEADPQAKRPSASLSPEDLSDEWYYLVCMSEFVFPNQSLPGKALEIGETVWLCNAQQAD 139

Query: 94 SKTFLRALLAKSASIQTIVCIPFMSGVLELG 124
 SK F R+LLAKSASIQT+VC P++ GV+E+G
 Sbjct: 140 SKFFSRSLAKSASIQTVVCFPYLGGVIEIG 170

Q401N5_9LILI

BHLH transcription factor [LHbHLH1] [Lilium hybrid division I]686 AA

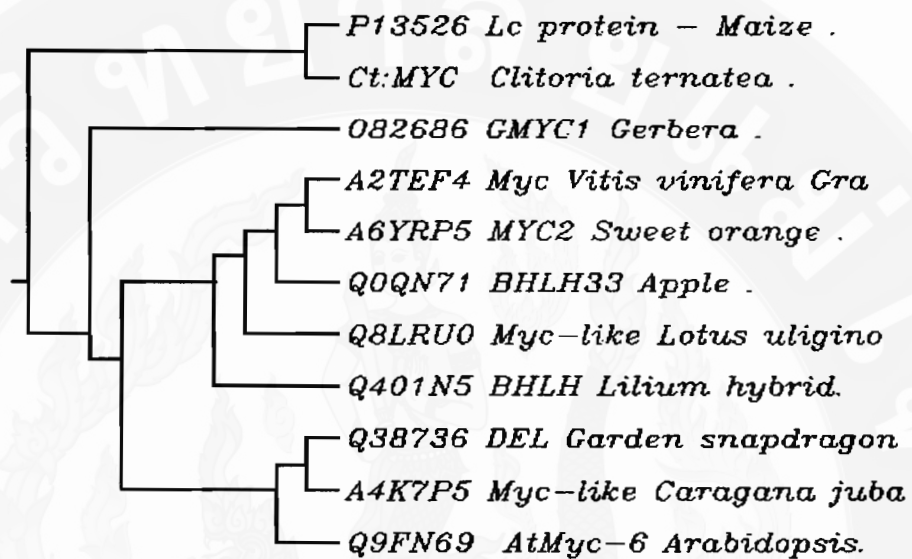
Score = 126 bits (316), Expect = 4e-28
 Identities = 53/91 (58%), Positives = 73/91 (80%)

Query: Putative *Myc* gene of *Clitoria ternatea*

Sbjct: *LHbHLH1* gene of *Lilium hybrid division I*

Query: 34 GEC DHRARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSAD 93
 G+ +H+ ++P A+LSPED+ D EWYYVVCMT++ +RPG+ LPG++ A N+ +W+ NA QAD
 Sbjct: 89 GDSNHQMKRPSASLSPEDLTDMEWYYVVCMSFTYRPGEWLPGKTLARNQYIWMSNAPSAD 148

Query: 94 SKTFLRALLAKSASIQTIVCIPFMSGVLELG 124
 ++ F R LLAKSAS+QT+VC PEM G LEIG
 Sbjct: 149 TELFSRTLLAKSASVQTVVCFPFMGGALELG 179



ภาพ : แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของ transcription factor gene MYC (bHLH) จากดอกอัญชัน เปรียบเทียบกับ พืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่รายงานใน Genbank