เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ศิริพร สิทธิประเสริฐ. 2531. พันธุวิศวกรรมปฏิบัติการเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร. ส.วิชาญการพิมพ์.

อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. 2533. การโคลนและการแสดงออกของ ไซแลเนสยีน จาก *Streptomyces sp.* 42-9 ใน *Streptomyces sp.* 190-1. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Berdy,J. 1980. Recent advances in and prospects of antibiotic reserch. Process Biochemistry. Oct./Nov. :28-35 Bibb,M.J. and Cohen,S.N. 1982. Gene expression in *Streptomyces* construction and application of promotor-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. Mol. Gen. Genet. 187 : 265-277.

Birnboim,O.H. and Doly,J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1522.

Birch,A.W. and Cullum,J. 1985. Temparative-sensitive mutant of the *Streptomyces* plasmid pIJ702. J.Gen.Microbiol. 131: 1299-1303.

Briggs,K.A., Lancashire,W.E and Hartley,B.S. 1984. Molecular cloning DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-xylose isomerase. The EMBO Journal. vol.3 no.3 : 611-616.

Bucke,C. 1977. Industrial glucose isomerase. In A. Wiseman(ed.), Topics in enzyme and fermentation biotechnology. vol.1 : 147-171.

Buttner,M.J. and Brown,N.L. 1987. Two promotors from the *Streptomyces* plasmid pIJ101 and their expression in *Escherichia coli*. Gene. 51: 179-186.

Burnett,W.V., Henner,J. and Eckhardt,T. 1987. The nucleotide sequence of the gene coding for XP55, a major secreted protein from *Streptomyces lividans*. Nucleic. Acid. Res. 15: 3926.

Chen,W.P. 1980. Glucose isomerase (a review) part one. Process Biochem. 6/7: 30-35.

Dekker,K., Yamagata,H., Sakaguchi,K. and Udaka,S. 1991. Xylose (glucose) isomerase gene from the thermophile *Thermus thermophilus* : Cloning, sequencing and comparison with other thermostable xylose isomerase. J.Bacteriol. 173: 3078-3083.

_____, Yamagata,H., Sakaguchi,K. and Udaka,S. 1991. Xylose (glucose) isomerase gene from the thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum* : Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. Agric.Biol.Chem. 55: 221-227.

Deng,Z., Kieser,T. and Hopwood,D.A. 1986. Expression of a *Streptomyces* plasmid promotor in *Escherichia coli*. Gene. 43: 295-300.

Dische,Z. and Borenfreund,E. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and triose. J. Biol. Chem. 192: 583-587.

Feldman,S.D., Sahm,H. and Sprenger,G.a. 1992. Cloning and expression of the genes for xylose isomerase and xylulo kinase from *Klebsiella pneuniae* 1033 in *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. 234: 201-210.

Goeddel,D.V., Heyneker,H.L., Hozumi,T., Arentzent,R., Itakura,K., Yansura,D.G., Ross,M.J., Miozzari,G., Crea,R. and Seeburg, P.H. 1979. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. Nature. 281: 544-548.

Gong,C-S., Chen,L-F., Flichinger,C.M., chiang,L-C., and Tsao,T.G. 1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbil. 41: 430-436.

Gil,J.A., Kieser,H.M. and Hopwood,D.A. 1985. Cloning of a chloramphenicol acetyltransferase gene of *Streptomyces acrimycini* and its expression in *Streptomyces* and *Escherichia coli* . Gene. 38: 1-8.

Hanahan,D. 1985. In DNA cloning 1st ed Glover, D.M. IRL Press. 109-135pp. ISBN 0-947946-18-7.

_____. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J.Mol.Biol. 166: 557-580.

Hopwood,D.A., Bibb,M.J., Chater,K.F., Kisser,T., Bruton,C.J. Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward,J.M. and Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces* : a laboratory manual. Norwich : UK. The John Innes Foundation

_____, Bibb,M.J., Chater,K.F., Janssen,G.R., Malpartida,F. and Smith,C.P. 1986. Regulation of gene expression in

antibiotic-producing *Streptomyces*. In : Booth,T.R. and Higgins,C.F.(eds.).Regulation of gene expression 25 years On,the 39th symposium of the society for general microbiology.Cambridge University Press, Cambridge(UK.): 251-276.

Horinouchi,S. and Beppu,T. 1985. Construction and application of a promotor-probe plasmid that allows chromogenic identification in *Streptomyces lividans* . J.Bacteriol. 162: 406-412.

Jaurin,B. and Cohen,S.N. 1984. *Streptomyces lividans* RNA polymerase recognizes and uses *Escherichia coli* transcriptional signals . Gene. 28: 83-91.

_____. and Cohen,S.N. 1985. *Streptomyces* contain *Escherichia coli*-type A+T-rich promotors having novel structural features. Gene. 39: 191-201.

Jeffries,T.W. 1983. Utilization of xylose by bacteria,yeasts and fungi. Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology. 27: 1-32.

Kieser,T. and Melton,R.E. 1988. Plasmid pIJ699, a multi-copy positive-selection vector for *Streptomyces*. Gene. 65: 83-91.

King,A.A. and Chater,K.F. 1986. The expression of the *Escherichia coli* *LacZ* gene in *Streptomyces*. J.Gen.Microb. 132: 1739-1752.

Lawlis,V.B., Dennis,M.S., Chen,E.Y., Smith,D. and Henner,D.J. 1984. Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulokinase gene of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 15-21.

Lederberg,E.M. and Cohen,S.N. 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. J.Bacteriol. 119: 1072-1074.

Lee,C., Bhatnagar,., Saha,B.C., Lee,Y.E., Takagi,M., Imanaga,T., Bagdasarian, M. and Zeikus, J.G. 1990. Cloning and expression of *Clostridium thermosulfurogenes* glucose isomerase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* Appl. Envi.Micro. vol.56 NO.9.: 2638-2643.

Lowry,O.H., Rosebrough,N.T., Farr,A.L. and Randall,R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Maleszka,R., Wang,P.Y. and Schneider,H. 1982. A ColE1 hybrid plasmid containing *Escherichia coli* genes complementing D-xylose negative mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Can. J, Biochem. 60: 144-151.

Maniatis, T., Fritsch, E.F, and Sambrook,J. 1982. Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

Marcel,T., Drocourt,D. and Tirary,G. 1987. Cloning of the glucose isomerase (D-xylose isomerase) and xylulose kinase genes of *Streptomyces violaceoniger*. Mol.Gen.Genet. 208: 121-126

Marshall,R.O. and Kooi,E.R. 1957. Enzyme conversion of D-glucose to D-fructose. Science. 125: 638-649.

Miller,J.H. 1972. Experiment in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Miyashita,K., Fujii,T. and Samada,Y. 1991. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. J.Gen.Microbiol. 137: 2065-2072

Mortlock, R.P. and Wood, W.A. 1964. Metabolism of pentose and pentitols by *Aerobacter* aerogenes . Demonstration of pentose isomerase, pentulokinase and pentitol dehydro genes enzyme families. J.Bacteriol. 88: 838-844

Nishimura,A., Morita,M., Nishimura,Y. and Sugino,Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucleic. Acid. Res. 18: 6169.

Ono,H., Hintermann,G., Crameri,R., Wallis,.G. and Hutter,R. 1982. Reiterated DNA sequences in a mutant strain of *Streptomyces glaucescens* and cloning of the sequence in *Escherichia coli*. Mol.Gen.Genet. 186: 106-110.

Robbins,P.W., Albright,C. and Benefield,B. 1986. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus*. chitinase (chitinase-63) in *E. coli*. J.Biol. Chem. 263: 443-447.

_____, Wirth,D.F. and Hering,C. 1981. Expression of the *Streptomyces* enzyme endoglycosidase H in *E. coli*. J.Biol. Chem. 256: 10640-10644

Rosenfeld,A.S., Stevis,E.P. and Ho,N.W.Y. 1984. Cloning and characterization of the *xyl* genes from *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 194: 410-415

Schellenberg,G.D., Sarthy,A., Larson,A.E., Backer,M.P., Crabb,J.W. Lidstrom,M., Hall,B.D. and Furlong,C.E. 1984. Xylose isomerase from *Escherichia coli* characterization of the protein and the structural gene. J. Biol. Chem. 259: 6826-6832.

Shamanna,D,K. and Sanderson,K.E. 1979. Genetics and regulation of D-xulose utilization in *Salmonella typhimurium* LT2. J.Bacteriol. 139: 71-79.

Supajunya,N. and Pinphanichakarn,P. 1984. Glucose isomerase from *Streptomyces* sp. strain 190-1 isolated from Thai soil. J.Sci. Res. 9: 27-38.

Tiraby,G., Drocourt,D., Reynes,P.J., Sicard,J.P., Farber,K.G., Glasfeld,A., Ring,D. and Petsko,A.G. 1990. Genetic,

enzymatic, and crystallographic studies of the glucose isomerase of two *Streptomyces* Species. In genetics and molecular biology of industrial microoranisms edited by Hershberger,C.L., Queener,S.W., Hegeman,G. American Society for microbiology, Washington, D.C.: 119-126.

Tsumura,N. and Sato,T. 1965. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose, part VI. properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenus*. Agric.Biol. Chem. 29: 1129-1134

Ueng,P.P., Volpp,K.J., Tucker,J.V., Gong,C.S. and Chen,L.F. 1985. Molecular cloning of the *Escherichia coli* gene encoding xylose isomerase. Biotechnology Lett. vol.7 No.3.:153-158

Vaheri,M. and Kauppinen,V. 1977. Improved microbial glucose isomerase production. Process Biochem. 13: 5-8

Vara,J., Malpartida,F., Hopwood,D.A. and Jimenez,A. 1985. Cloning and expression of a puromycin *N*-acetyl transferase gene from *Streptomyces albonigер* in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Gene. 33: 197-206.

Wilhelm,M. and Hollenberg,C.P. 1985. Nucleotide sequence of the *Bacillus Subtilis* xylose isomerase gene : extensive homology between the *Bacillus* and *Escherichia coli* enzyme. Nucleic. Acids. Res. 13: 57113-5722.

Williams,S.T., Goodfellow,M., Alderson,G., Wellington,E.M.H., Sneath,P.H.A. and Sackin,M.J. 1983. Numerical classifi cation of *Streptomyces* and related genera. J. Gen. Micro biol. 129: 1743-1813.

Wong,H.C., Ting,Y., Lin,H-C., Reichert,F., Myambo,K., Watt,W.K.K, Toy,L.P. and Drummond,J.R. 1991. Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. J.Bacteriol. 21: 6849-6858.

Zalacain,M., Malpartida,F., Pulido,D. and Jimenez,A. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. Eur,J.Biochem. 162: 413-418.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria Bertani (LB)

ทริปโตน (tryptone)	10.0 กรัม
ผงสกัดยีสต์ (yeast extract)	5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 โดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่เจือจาง แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 2 ส่วน คือ

- 5 มล. ในหลอดแก้ว
- 100 มล. ในฟลาสก์

นำไปออโตเคลบที่ 121° ซ 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว เป็น เวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ให้ใส่วุ้น (agar) จำนวน 15 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1000 มล.

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB สำหรับ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pUC18 และ pUC19 ต้องใส่ยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน (Ampicillin) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่มีอุณหภูมิประมาณ 55°ซ โดยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มล.สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อ และ 50 ไมโครกรัม/มล. สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ก2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร MS

มานิทอล (mannitol)	20.0 กรัม
ถั่วเขียวบดละเอียด	20.0 กรัม
วุ้น (agar)	18.0 กรัม

เติมน้ำประปาและน้ำกลั่น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน จนได้ปริมาณ 1 ลิตร นำไปออโตเคลบที่ 121 °ซ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก3. <u>อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส</u>

สำหรับ Streptomyces sp.190-1

ไซโลส (xylose)	0.6	กรัม
เปปโตน (Bacto-peptone)	1.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์ (yeast extract)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

สำหรับ *E. coli* HB101 ที่มีพลาสมิดพาหะ หรือ รีคอมบิแนนต์พลาสมิด ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 0.2% glucose หรือ 0.2% xylose ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มล.

ก4. <u>อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร MacConkey Agar base</u>

MacConkey agar base เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปจาก difco,U.S.A. ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ โดยนำมาเติมไซโลส ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1% และเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่มีอุณหภูมิประมาณ 55°ซ

ก5. <u>อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร SOB และ SOC</u>

-สูตร SOB

ทริปโตน (tryptone)	20.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.6	กรัม
โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	10.0	มิลลิโมลาร์

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	10.0	มิลลิโมลาร์
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

นำไปออโตเคลบที่ 121° ซ 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว เป็น เวลา 15 นาที สำหรับ $MgCl_2$ และ $MgSO_4$ ให้แยกฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน

-สูตร SOC คือสูตร SOB ที่เติมกลูโคส 0.2 มิลลิโมลาร์

ภาคผนวก ข.

สารเคมี และ บัฟเฟอร์

ข1. สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme solution)

สำหรับ *E. coli* (ศิริพร,2531)

กลูโคส (glucose)	50.0 มิลลิโมลาร์
ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl pH 8.0)	25.0 มิลลิโมลาร์
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) pH8.0	10.0 มิลลิโมลาร์
ไลโซไซม์ (lysozyme)	5.0 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยผสมสารละลายเหล่านี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วปลอดเชื้อเชื้อ

สำหรับ *Streptomyces* sp.190-1

ซูโครส (Sucrose)	0.3 โมลาร์
ทริสมาเบส (Trisma base pH 8.0)	25.0 มิลลิโมลาร์
EDTA	0.25 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยผสมสารละลายเหล่านี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วปลอดเชื้อ

ข2. สารละลายไลซีส (Lysis solution)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	0.2 โมลาร์
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	1.0 %

เตรียมโดยผสมสารละลายเหล่านี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วปลอดเชื้อ

ข3. บัฟเฟอร์ TE

ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0	10.0 มิลลิโมลาร์
EDTA pH 8.0	1.0 มิลลิโมลาร์

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการออโตเคลบที่ 121°ซ ภายใต้ความดัน 15ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข4. 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเทต pH 4.8

โซเดียมอะซิเตรท	40.8 กรัม
น้ำกลั่น	100 มล.

ปรับให้ได้ pH 4.8 ด้วยกรดอะซิติคเข้มข้น (gracial acetic acid) ทำให้ปลอดเชื้อโดยการออโตเคลบที่ 121°ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข5. 5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (5M NaCl)

โซเดียมคลอไรด์ (Nacl)	14.61 กรัม
น้ำกลั่น	50.0 มล.

ข6. บัฟเฟอร์ TAE 50x

ทริสมาเบส (40 มิลลิโมลาร์)	242.0 กรัม
กรดอะซิติด (20 มิลลิโมลาร์)	57.1 กรัม
EDTA (2 มิลลิโมลาร์)	37.2 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

ปรับให้ได้ pH 8.0 ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า

ข7. ฟีนอลคลอโรฟอร์ม

ฟีนอล (phenol)	5.0 กรัม
คลอโรฟอร์ม (chloroform)	5.0 มล.
น้ำกลั่น	1.0 มล.
ไอดรอกซีควิโนลิน (8-hydroxyquinoline)	5.0 มก.

เตรียมโดยผสมสารละลายเหล่านี้เข้าด้วยกันในขวดแก้วสีชา

ข8. สีติดตาม (tracking dye)

เตรียมเข้มข้น 5 เท่า

ซูโครส (sucrose)	60	%
โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue)	0.25	%
ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ (trisma-HCl pH 8.0)	100	มิลลิโมล
EDTA	0.5	มิลลิโมล
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	100	มิลลิโมล

ข9. ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล GENECLEAN kit ประกอบด้วย

-สารละลายโซเดียมไอโอไดด์ (NaI)

-สารละลาย NEW

-Glassmilk

ข10. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีน ตามวิธีของ Lowry 1951

Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโปรตัสเซียมทาร์เทรท ($C_4H_4KNaO\ 4H_2O$)	0.6	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 3 ลิตร

Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	ลิตร

Lowry C

Lowry A	50 ส่วน
Lowry B	1 ส่วน

Lowry D (phenol reagent)

สารละลาย Folin phenol reagent	1 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

ข11. ชุดติดฉลากดีเอ็นเอของ ECL (direct nucleic acid labelling and detection systems) ของ Amersham, U.K.ประกอบด้วย

-hybridization buffer

-blocking reagent

-glutaraldehyde

-control DNA

-detection reagent 1

-detection reagent 2

-DNA labelling reagent

ข12. สารละลาย depurination

ไฮโดรคลอไรด์ (HCl)	250 มิลลิโมลาร์

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการจะเตรียม ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำไปออโตเคลบที่ 121 °ซ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข13. สารละลาย denaturation

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.5 โมล์
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	0.5 โมล์

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการจะเตรียม ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำไปออโตเคลบที่ 121 °ซ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข14. สารละลาย neutralization

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.5 โมล์
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl)	0.5 โมล์

ปรับให้ได้ pH 7.5 เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการจะเตรียม

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนำไปออโตเคลบ ที่ 121°ซ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข15. 20x SSC

โซเดียมซิเตท	0.5 โมล์
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	3.0 โมล์

ปรับให้ได้ pH 7.0

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการจะเตรียม ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนำไปออโตเคลบ ที่ 121°ซ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข16. บัฟเฟอร์ Primary wash

ยูเรีย (Urea)	360.0	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	4.0	กรัม
20X SSC	25.0	มล.

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

ข17. บัฟเฟอร์ Secondary wash

20X SSC	100 มล.

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

ข18. น้ำยาล้างฟิล์มเอกซเรย์

จากบริษัท Kodak, U.S.A.

-Developer

-Fixer

ข19. <u>บัฟเฟอร์สำหรับทรานสฟอร์เมชัน 1</u>

รูบิเดียมคลอไรด์ ($RbCl_2$)	12.0	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	9.9	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	1.5	กรัม
กลีเซอรอล	150.0	กรัม
โปแทสเซียมอะซิเทต pH 7.5	30.0	มิลลิโมลาร์
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

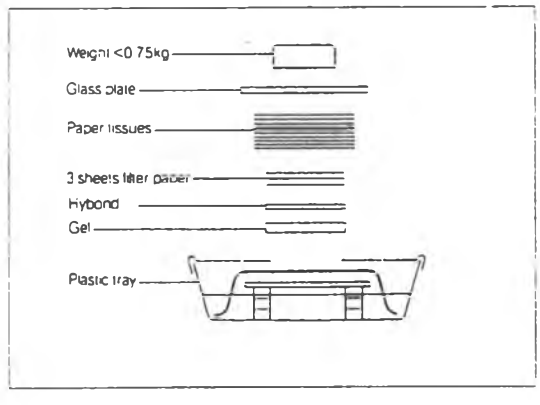
ปรับให้ได้ pH 5.8 ด้วย 0.2 มิลลิโมลาร์ กรดอะซีติค ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน

ข20. <u>บัฟเฟอร์สำหรับทรานสฟอร์เมชัน 2</u>

MOPS pH 6.8	0.5	มิลลิโมลาร์
รูบิเดียมคลอไรด์	1.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	11.0	กรัม
กลีเซอรอล	150.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน

ภาคผนวก ค



รูปแสดงการทำ capillary blotting

ประวัติผู้เขียน

นางสาว รัชนี ไสยประจง เกิดเมื่อวันที่ 10 ธันวาคม 2512 ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จาก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2532