

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กรมควบคุมมลพิษ. 2547. **พีเอเอช (โพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน)**. ส่วนแผนงานและประมวลผล สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย, กรุงเทพมหานคร.
- พรศรี สุทธนารักษ์. 2533. **ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในสภาวะแวดล้อมทางทะเลบริเวณอุตสาหกรรมแปรสภาพเรือเหล็กเก่า มาบตาพุด จังหวัดระยอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท **มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
- อรสุภาวี สายเพชร. 2545. **การย่อยสลายพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนฟทีน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท **มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**.

ภาษาอังกฤษ

- Allen CC, Boyd C, Larkin MJ, Reid KA, Sharma ND, Wilson K. 1997. Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. **Appl Environ Microbiol** 63:151-55.
- Ashok BT, Saxena S. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons-a review. **J. Sci. Ind. Res.** 54:443-51.
- Ausubel FM, Brent RE, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1999. **Current protocol in molecular biology**. New York, John Wiley and Sons.
- Batie CJ, Ballou DP, Correll CC. 1992. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. **Chemistry and biochemistry of flavoenzymes.** 3:543-56.
- Bosch R, Garcia-Valdes E, Moore ER. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. **Gene** 236:149-57.
- Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele JP. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. **Appl Microbiol Biotechnol** 43:156-64.

- Butler CS, Mason JR. 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. **Adv Microb Physiol** 38:47-84.
- Cairns MA, Nebeker AV. 1982. Toxicity of acenaphthene and isophorone to early life stages of fathead minnows. **Arch Environ Contam Toxicol** 11:703-7.
- Carredano E, Karlsson A, Kauppi B, Choudhury D, Parales RE, Parales JV, Lee K, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S. 2000. Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding. **J Mol Biol** 296:701-12.
- Cerniglia CE. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation** 3:351-68.
- Davies JI, Evans WC. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads the ring-fission mechanism. **Biochem J** 91:251-61.
- Demaneche S, Meyer C, Micoud J, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y. 2004. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. **Appl Environ Microbiol** 70:6714-25.
- Denome SA, Stanley DC, Olson ES, Young KD. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. **J Bacteriol** 175:6890-901.
- Di Gioia D, Barberio C, Spagnesi S, Marchetti L, Fava F. 2002. Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. **Arch Microbiol** 178:208-17.
- Ensley BD, Gibson DT. 1983. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. **J Bacteriol** 155:505-11.
- Fukuda K, Nagata S, Taniguchi H. 2002. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading bacteria. **FEMS Microbiol Lett** 208:179-85.
- Gibson DT. 1999. *Beijerinckia* sp. strain B1: a strain by any other name. **J Ind Microbiol Biotechnol** 23:284-93.

- Gibson DT, Parales RE. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** 11:236-43
- Goyal AK, Zylstra GJ. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. **Appl Environ Microbiol** 62:230-6.
- Grifoll M, Casellas M, Bayona JM, Solanas AM. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. **Appl Environ Microbiol** 58:2910-7.
- Grosser RJ, Warshawsky D, Vestal JR. 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. **Appl Environ Microbiol** 57:3462-9.
- Habe H, Omori T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. **Biosci Biotechnol Biochem** 67:225-43.
- Hamann C, Hegemann J, Hildebrandt A. 1999. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. **FEMS Microbiol Lett** 173:255-63.
- Hegg EL, Que L, Jr. 1997. The 2-His-1-carboxylate facial triad-an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. **Eur J Biochem** 250:625-9.
- Hernaiz MJ, Reineke W, Santero E. 1999. Genetic analysis of biodegradation of tetralin by a *Sphingomonas* strain. **Appl Environ Microbiol** 65:1806-10.
- Holcombe GW, Phipps GL, Fiandt JT. 1983. Toxicity of selected priority pollutants to various aquatic organisms. **Ecotoxicol Environ Saf** 7:400-9.
- Hormisch D, Brost I, Kohring GW, Giffhorn F. 2000. Degradation of acenaphthene and acenaphthylene by isolated bacteria and influence of fertilizers on the PAH degrading populations in soils. Proc. Forum. **Appl Biotech** 11:157-60.
- Howard PH, Boethling RS, Jarvis WF, Meylan WM, Michaelenko EM. 1991. **Handbook of Environmental Degradation Rates**: Lewis Publishers, Inc., Michigan USA.
- Hwang S, Kim SJ, Kim CK, Kim Y, Kim YC. 1999. The *phnIJ* genes encoding acetaldehyde dehydrogenase (acylating) and 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase in *Pseudomonas* sp. DJ77 and their evolutionary implications. **Biochem Biophys Res Commun** 256:469-73.

- IARC. 1999. Overall Evaluations of Carcinogenicity of Humams. International Agency for Research on Cancer. <http://193.51.164.11/monoeval/erthall.html>. Last updated: 20 January 1999.
- Imshenetskii AA, Kondrat'eva TF, Lin'kova MA. 1985. Mutagenic action of acenaphthene on haploid and diploid cultures of *Candida scottii*. *Mikrobiologiya* 54:360-2.
- Inoue K, Habe H, Yamane H, Omori T, Nojiri H. 2005. Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiol Lett* 245:145-53.
- Iwabuchi T, Harayama S. 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. *J Bacteriol* 179:6488-94.
- Jakoncic J, Jouanneau Y, Meyer C, Stojanoff V. 2007. The catalytic pocket of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *Biochem Biophys Res Commun* 352:861-6.
- Jones KC, Stratford JA, Waterhouse KS, Vogt NB. 1989. Organic contaminants in Welsh soils: Polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Technol* 23:540-50.
- Kasuga K, Nojiri H, Yamane H, Kodama T, Omori T. 1997. Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63. *J Ferment Bioeng* 84:387-99.
- Kauppi B, Lee K, Carredano E, Parales RE, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* 6:571-86.
- Keenan BG, Leungsakul T, Smets BF, Wood TK. 2004. Saturation mutagenesis of *Burkholderia cepacia* R34 2,4-dinitrotoluene dioxygenase at DntAc valine 350 for synthesizing nitrohydroquinone, methylhydroquinone, and methoxyhydroquinone. *Appl Environ Microbiol* 70:3222-31.

- Khan AA, Wang RF, Cao WW, Franklin W, Cerniglia CE. 1996. Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int J Syst Bacteriol* 46:466-9.
- Khan AA, Wang RF, Cao WW, Doerge DR, Wennerstrom D, Cerniglia CE. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol* 67:3577-85.
- Kim E, Zylstra GJ. 1999. Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and m-xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:294-302.
- Kim SJ, Kweon O, Jones RC, Freeman JP, Edmondson RD, Cerniglia CE. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *J Bacteriol* 189:464-72.
- Kiyohara H, Torigoe S, Kaida N, Asaki T, Iida T, Hayashi H, Takizawa N. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J Bacteriol* 176:2439-43.
- Komatsu T, Omori T, Kodama T. 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:864-865.
- Kouzuma A, Pinyakong O, Nojiri H, Omori T, Yamane H, Habe H. 2006. Functional and transcriptional analyses of the initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. *Microbiology* 152:2455-67.
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y. 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J Bacteriol* 185:3828-41.

- Kulakov LA, Chen S, Allen CC, Larkin MJ. 2005. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene. **Appl Environ Microbiol** 71:1754-64.
- Kurkela S, Lehvaslaiho H, Palva ET, Teeri TH. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. **Gene** 73:355-62.
- Larkin MJ, Allen CC, Kulakov LA, Lipscomb DA. 1999. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. **J Bacteriol** 181:6200-4.
- Laurie AD, Lloyd-Jones G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. **J Bacteriol** 181:531-40.
- Mason JR, Cammack R. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. **Annu Rev Microbiol** 46:277-305.
- Mattox CF, Humanick MJ. 1980. Organic groundwater contaminants from UCG. **In situ** 4:129-51.
- Nam JW, Nojiri H, Yoshida T, Habe H, Yamane H, Omori T. 2001. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. **Biosci Biotechnol Biochem** 65:254-63.
- Ntougias S, Zervakis GI, Ehalotis C, Kavroulakis N, Papadopoulou KK. 2006. Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. **Res Microbiol** 157:376-85.
- Parales RE, Lee K, Resnick SM, Jiang H, Lessner DJ, Gibson DT. 2000. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. **J Bacteriol** 182:1641-9.
- Parales RE. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. **J Ind Microbiol Biotechnol** 30:271-8.

- Pinyakong O, Habe H, Supaka N, Pinpanichkarn P, Juntongjin K, Yoshida T, Furihata K, Nojiri H, Yamane H, Omori T. 2000. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. **FEMS Microbiol Lett** 191:115-21.
- Pinyakong O, Habe H, Omori T. 2003a. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **J Gen Appl Microbiol** 49:1-19.
- Pinyakong O, Habe H, Yoshida T, Nojiri H, Omori T. 2003b. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. **Biochem Biophys Res Commun** 301:350-7.
- Pinyakong O. 2003c. Biochemical and genetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in sphingomonads: **PhD thesis**. The University of Tokyo, Tokyo.
- Pinyakong O, Habe H, Kouzuma A, Nojiri H, Yamane H, Omori T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. **FEMS Microbiol Lett** 238:297-305.
- Pollmann K, Wray V, Hecht HJ, Pieper DH. 2003. Rational engineering of the regioselectivity of TecA tetrachlorobenzene dioxygenase for the transformation of chlorinated toluenes. **Microbiology** 149:903-13.
- Pothuluri JV, Freeman JP, Evans FE, Cerniglia CE. 1992. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Appl Environ Microbiol** 58:3654-9.
- Romine MF, Stillwell LC, Wong KK, Thurston SJ, Sisk EC, Sensen C, Gaasterland T, Fredrickson JK, Saffer JD. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. **J Bacteriol** 181:1585-602.
- Saipheth A, Juntongjin K, Pattaragulwanit K, Pinphanichakarn P, Thaniyavarn S. 2006. Novel acenaphthene degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain SP2. **J Sci Res Chula Univ** 31:83-94.

- Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 182:2134-41.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanseverino J, Applegate BM, King JM, Saylor GS. 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. **Appl Environ Microbiol** 59:1931-7.
- Schocken MJ, Gibson DT. 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. **Appl Environ Microbiol** 48:10-6.
- Selifonov SA, Slepchenkin AV, Adamin VM, Grechkina GM, Starovoitov II. 1993. Acenaphthene catabolism by strains of *Alcaligenes eutrophus* and *Alcaligenes paradoxus*. **Microbiology (English translation of Mikrobiologiya)** 62:85-91.
- Selifonov SA, Grifoll M, Eaton RW, Chapman PJ. 1996. Oxidation of naphthoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. **Appl Environ Microbiol** 62:507-514
- Selifonov SA, Chapman PJ, Akkerman SB, Gurst JE, Bortiatynski JM, Nanny MA, Hatcher PG. 1998. Use of ¹³C nuclear magnetic resonance to assess fossil fuel biodegradation: fate of [1-¹³C]acenaphthene in creosote polycyclic aromatic compound mixtures degraded by bacteria. **Appl Environ Microbiol** 64:1447-53.
- Shepherd JM, Lloyd-Jones G. 1998. Novel carbazole degradation genes of *Sphingomonas* CB3: sequence analysis, transcription, and molecular ecology. **Biochem Biophys Res Commun** 247:129-35.
- Shi T, Fredrickson JK, Balkwill DL. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. **J Ind Microbiol Biotechnol** 26:283-9.

- Sho M, Hamel C, Greer CW. 2004. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. **FEMS Microbiol Ecol** 48:209-20.
- Simon MJ, Osslund TD, Saunders R, Ensley BD, Suggs S, Harcourt A, Suen WC, Cruden DL, Gibson DT, Zylstra GJ. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB9816-4. **Gene** 127:31-7.
- Sohn JH, Kwon KK, Kang JH, Jung HB, Kim SJ. 2004. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. **Int J Syst Evol Microbiol** 54:1483-7.
- Suenaga H, Watanabe T, Sato M, Ngadiman, Furukawa K. 2002. Alteration of regiospecificity in biphenyl dioxygenase by active-site engineering. **J Bacteriol** 184:3682-8.
- Suenaga H, Goto M, Furukawa K. 2006. Active-site engineering of biphenyl dioxygenase: effect of substituted amino acids on substrate specificity and regiospecificity. **Appl Microbiol Biotechnol** 71:168-76.
- Supaka N, Pinphanichakarn P, Pattaragulwanit K, Thaniyavarn S, Omori T, Junthongjin TK. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthrene and pyrene via cometabolism. **Science Asia** 27:21-28.
- Takeuchi M, Hamana K, Hiraishi A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **Int J Syst Evol Microbiol** 51:1405-17.
- Takizawa N, Iida T, Sawada T, Yamauchi K, Wang YW, Fukuda M, Kiyohara H. 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. **J Biosci Bioeng** 87:721-31.
- U.S.EPA. 1989. **Mouse Oral Subchronic Toxicity Study with Acenaphthene**. Washington, DC, 89 pp.

- Wackett LP, Kwart LD, Gibson DT. 1988. Benzylic monooxygenation catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida*. **Biochemistry** 27:1360-7.
- Werwath J, Arfmann HA, Pieper DH, Timmis KN, Wittich RM. 1998. Biochemical and genetic characterization of a gentisate 1, 2-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW5. **J Bacteriol** 180:4171-6.
- Wilson SC, Jones KC. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Environ Pollut** 81:229-49.
- Xia Y, Min H, Rao G, Lv ZM, Liu J, Ye YF, Duan XJ. 2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. **Biodegradation** 16:393-402.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene** 33:103-19.
- Yen KM, Gunsalus IC. 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. **Proc Natl Acad Sci USA** 79:874-8.
- Yen KM, Serdar CM. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. **Crit Rev Microbiol** 15:247-68.
- Zhou NY, Fuenmayor SL, Williams PA. 2001. *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. **J Bacteriol** 183:700-8.
- Zipper C, Nickel K, Angst W, Kohler HP. 1996. Complete microbial degradation of both enantiomers of the chiral herbicide mecoprop [(RS)-2-(4-chloro-2-methylphenoxy) propionic acid] in an enantioselective manner by *Sphingomonas herbicidovorans* sp. nov. **Appl Environ Microbiol** 62:4318-22.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งละลายผงวุ้นหรือแบคทีอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium, CFMM)

สารละลายส่วนที่ 1

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.8	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายส่วนที่ 2

เฟอร์ริสคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม/มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม/มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายส่วนที่ 2 ชนิดละ 1 มิลลิลิตรต่อสารละลายส่วนที่ 1 1,000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Yb

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตเนน (tryptone)	20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5	กรัม

ละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งละลายผงวุ้นหรือแบคทีโอะการ์ 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

สารละลายส่วนที่ 1

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตเนน (tryptone)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.58	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2.46	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.18	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับความเป็นปริมาตรสุดท้าย 980 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายส่วนที่ 2

กลูโคส	3.6	กรัม
น้ำปลอดประจุ	20	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 ส่วน เก็บรักษาที่ -20 °ซ

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมสารละลาย

เอทานอล 70%

เอทานอล 99%	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

Sodium lauryl sulfate	10	กรัม
-----------------------	----	------

ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมด เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นิ่งมาเพื่อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K)

โปรตีนเนสเค (proteinase K)	10	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุและเชื้อ	1	มิลลิลิตร

สารละลาย Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Trizma base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	1.2	กรัม
---	-----	------

ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งมาเพื่อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA ($C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์จนให้เข้ากัน รอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	10	มิลลิลิตร
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TEG

สารละลายส่วนที่ 1

Tris-HCl pH 8 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 95 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายส่วนที่ 2

กลูโคส (glucose)	0.9	กรัม
น้ำปลอดประจุ	5	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 ส่วน เก็บรักษาที่ 4 °ซ

สารละลายไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์ (Lysozyme)	60	มิลลิกรัม
บัฟเฟอร์ TE	1	มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 29.2 กรัม

ละลายในน้ำปลอดประจุจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอ้มัล

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายโพแทสเซียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์

โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK) 49.07 กรัม

ละลายในน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายโซเดียมอะซิเตรตเข้มข้น 3 โมลาร์

โซเดียมอะซิเตรต ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 40.82 กรัม

ละลายในน้ำปลอดประจุจนได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย CTAB/NaCl (Hexadecyl trimethyl ammoniumbromide/sodium chloride)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
CTAB	10	กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 65 °C ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 :1 (ปริมาตร ต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม

เตรียมสารละลายฟีนอลอิมิตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °C จากนั้นเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าคนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าคนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำขั้นนี้หลายๆ ครั้งด้วย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรดต่างของฟีนอลมากกว่า 7.8 สุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้นเป็น 0.1 โมลาร์ ที่ผสม β -mercaptoethanol เข้มข้น 0.2% ปริมาตร 0.1 เท่าของฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C ผสมฟีนอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 25:25 (ปริมาตรต่อ ปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า

Tris-HCl	242	กรัม
EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9%

อะกาโรสเจล	9	กรัม
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 1 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอธิเดียมโบรไมด์	0.1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันเก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด (ขณะเตรียมควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง)

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin, Ap)

แอมพิซิลิน	100	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารปฏิชีวนะคลอแรมฟิสิกอล (Chloramphenicol, Cm)

คลอแรมฟิสิกอล	34	มิลลิกรัม
99% เอทานอล	1	มิลลิลิตร

2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal)

X-gal	20	มิลลิกรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 โมลาร์

IPTG	238	มิลลิกรัม
น้ำปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลาย PAHs ได้แก่ อะซีแนพทีน อะซีแนพทีลีน พีแนนทรีน แอนทราซีน ไพรีน และ ฟลูออแรนทีน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (10,000 ppm)

สารประกอบ PAHs	0.1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	10	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายแนพธาซีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (100,000 ppm)

แนพธาซีน	1	กรัม
ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	10	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลาย TfbI

โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK)	0.295 กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.148 กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.99 กรัม
กลีเซอรอล	15 มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 5.8 ด้วย และปรับปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

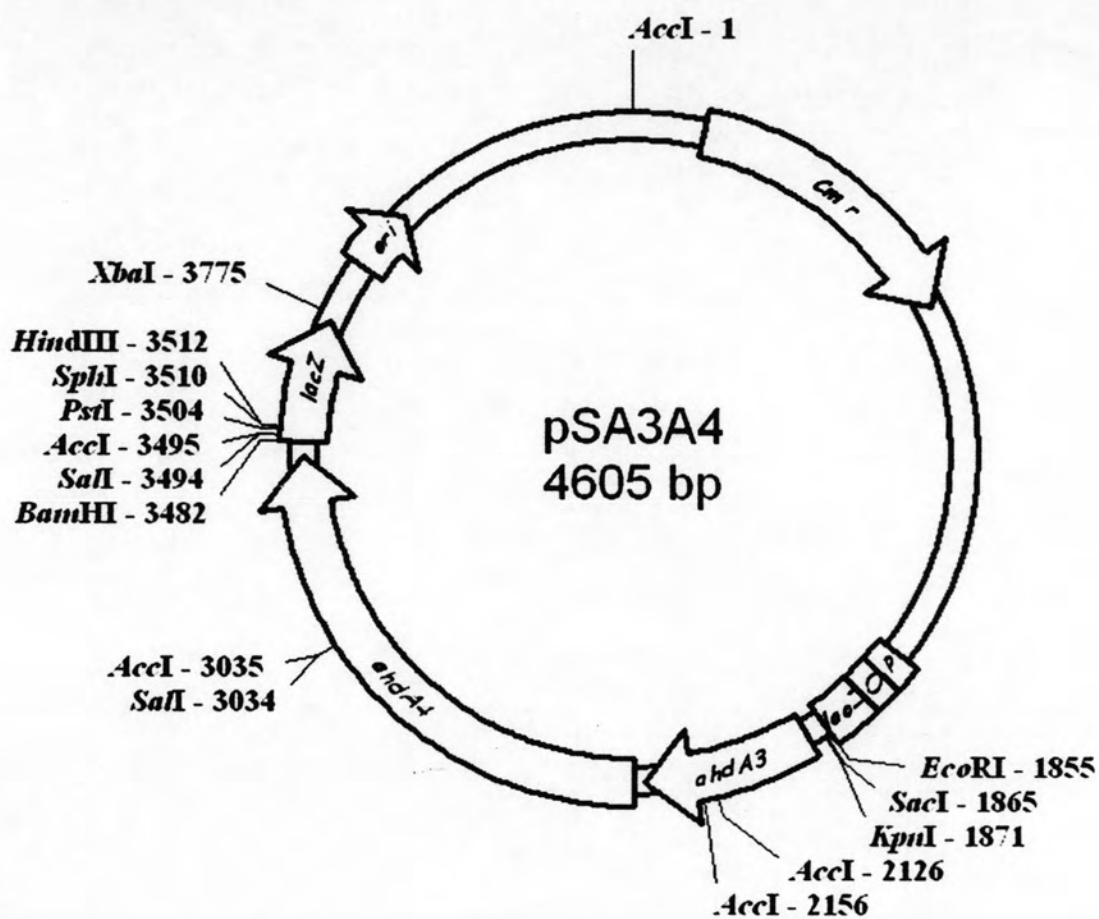
สารละลาย TfbII

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES)	0.29 กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์ (RbCl)	0.121 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.103 กรัม
กลีเซอรอล	15 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ภาคผนวก ค

แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของ pSA3A4



รูปที่ ค.1 แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะและกรอบการแสดงออกบนพลาสมิด pSA3A4

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ SP2

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

(อรุณภาวี สายเพชร, 2545)

```

1  ACGATTCACC  CCAGTCGCTG  ATCCCACCGT  GGTTAGCTGC  CTCCGTTGCC
51  GGTTAGCGCA  CTACCTTCGG  GTGAAACCAA  CTCCCATGGT  GTGACGGGCG
101  GTGTGTACAA  GGCCTGGGAA  CGTATTCACC  GCGGCATGCT  GATCCGCGAT
151  TACTAGCGAT  TCCGCCTTCA  TGCTCTCGAG  TTGCAGAGAA  CAATCCGAAC
201  TGAGACGGCT  TTTGGAGATT  AGCTTGTGCT  CGCGCACTTG  CTGCCCACTG
251  TCACCGCCAT  TGTAGCACGT  GTGTAGCCCA  GCGTGTAAGG  GCCATGAGGA
301  CTTGACGTCA  TCCCCACCTT  CCTCCGGCTT  ATCACCGGCA  GTTTCCTTAG
351  AGTGCCCAAC  CAAATGATGG  CAACTAAGGA  CGAGGGTTGC  GCTCGTTGCG
401  GTACTTAACC  CAACATCTCA  CGACACGAGC  TGACGACAGC  CATGCAGCAC
451  CTGTCACTGA  TCCAGCCGAA  CTGAAGGAAA  AGATCTCTCT  AATCCGCGAT
501  CAGGATGTCA  AACGCTGGTA  AGGTTCTGCG  CGTTGCTTCG  AATTAAACCA
551  CATGCTCCAC  CGCTTGTGCA  GGCCCCCGTC  AATTCCTTTG  AGTTTTAATC
601  TTGCGACCGT  ACTCCCCAGG  CGGATAACTT  AATGCGTTAG  CTGCGCCACC
651  CAAACACCAT  GTGCCCCGAC  AGCTAGTTAT  CATCGTTTAC  GCGGTGGACT
701  ACCAGGGTAT  CTAATCCTGT  TTGCTCCCCA  CGCTTTCGCA  CCTCAGCGTC
751  AATACTTGTC  CAGTCAGTCG  CCTTCGCCAC  TGGTGTTCCT  CCGAATATCT
801  ACGAATTTCA  CCTCTACACT  CGGAATTCCA  CTGACCTCTC  CAAGATTCTA
851  GTCACCTAGT  TTCAAAGGCA  GTTCCGGGGT  TGAGCCCCGG  GCTTTCACCT
901  CTGACTTGAG  TAACCGCCTA  CGCGCGCTTT  ACGCCCAGTA  ATTCCGAACA
951  ACGCTAGCTC  CCTCCGTATT  ACCGCGGCTG  CTGGCACGGA  GTTAGCCGGA
1001  GCTTATTCTC  CAGGTAATGT  CATTATCATC  CCTGGTAAAA  GAGCTTTACA
1051  ACCCTAAGGC  CTTCATCACT  CACGCGGCAT  GCTGGATCAG  GCTTTCGCCC
1101  ATTGTTCCAA  TATTCCCCAC  TGCTGCCCCC  GTAGGAGTCT  GGGCCGTGTC
1151  TCAGTCCCAG  TGTGGCTGAT  CATCCTCTCA  GACCAGCTAA  GGATCGTCGC
1201  CTTGGTAGGC  CATTACCCCA  CCAACTAGCT  AATCCTACGC  GGGCTCATCC
1251  CTTGCCGATA  ATCTTTGGTC  CGAAGACATC  ATCCGGTATA  TAGCAGTAAT
1301  TTCTCACTGT  TATTCGAAG  CAAAGGGCAG  ATTCCCACGC  GTTACGCACC
1351  CGTGCGCCAC  TAGACCCGAA  GGTCTCGTTC  GACTTGCATG  TGTTAGGCAT
1401  GCCGCCAGCG  TTCGTT

```

2. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสายพันธุ์ SP2

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 กับข้อมูลที่มีใน database GenBank DDBJ และ EMBL ซึ่งนำลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,416 เบสมา เปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม BlastN ดังแสดงผลในแผนวตารางที่ ง.1

ตารางที่ ง.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BlastN)

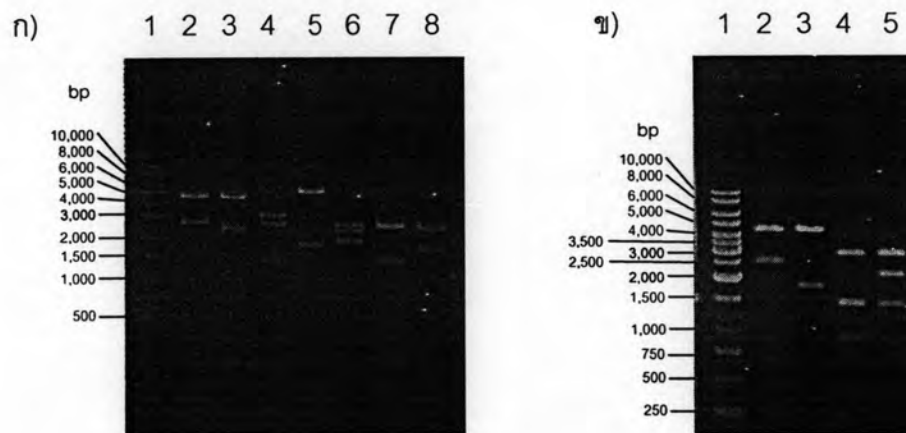
ลำดับที่	Close strains	Sequence identity (%)	Accession no.	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Sphingomonas</i> sp. D16	1412/1418 (99%)	AF025352	-
2	<i>Novosphingobium</i> sp.SM17	1372/1379 (99%)	EF424403	-
3	<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> strain US6-1	1391/1415 (98%)	AF502400	Sohn และคณะ, 2004
4	<i>Sphingomonas</i> sp. SB5	1388/1413 (98%)	AY245435	-
5	<i>Novosphingobium</i> sp. phe-8	1388/1416 (98%)	DQ345315	-
6	<i>Novosphingobium</i> sp.SM16	1348/1370 (98%)	EF424402	-
7	<i>Sphingomonas</i> sp. PF-I	1382/1415 (97%)	DQ207361	-
8	<i>Sphingomonas</i> sp. AV6C	1378/1412 (97%)	AF434172	Di Gioia และคณะ, 2002
9	<i>Novosphingobium</i> sp. R-5	1375/1415 (97%)	AY914073	Ntougias และคณะ, 2002
10	<i>Novosphingobium</i> sp. TUT562	1373/1415 (97%)	AB177883	-
11	<i>Sphingomonas</i> sp. WSCII	1372/1414 (97%)	AY344805	-
12	<i>Sphingomonas</i> sp. IC081	1377/1416 (97%)	AB196250	Inoue และคณะ, 2005

ภาคผนวก จ

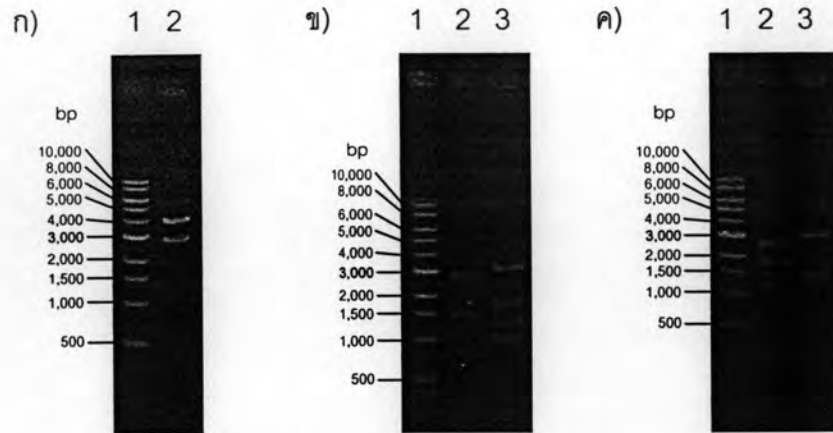
ผลการทดลองเรื่องการหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ

1. การหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของดีเอ็นเอแทรกสอดใน pPC1

แสดงภาพถ่าย 0.9% อะกาโรสเจล ซึ่งแยกภายใต้บัฟเฟอร์ TAE โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 30 นาที ในการหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pPC1



รูปที่ ๑.1 ภาพถ่าย 0.9% อะกาโรสเจล ภาพ ก) ช่องวิ่งที่ 1: 1 kb DNA ladder เข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *EcoRI* ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *HindIII* ช่องวิ่งที่ 4: ตัดด้วย *PstI* ช่องวิ่งที่ 5: ตัดด้วย *SphI* ช่องวิ่งที่ 6: ตัดด้วย *EcoRI* และ *HindIII* ช่องวิ่งที่ 7: ตัดด้วย *EcoRI* และ *PstI* และช่องวิ่งที่ 8: ตัดด้วย *EcoRI* และ *SphI* ภาพ ข) ช่องวิ่งที่ 1: 1 kb DNA ladder เข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *EcoRI* ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *HindIII* และ *SphI* ช่องวิ่งที่ 4: ตัดด้วย *HindIII* และ *PstI* และช่องวิ่งที่ 5: ตัดด้วย *PstI* และ *SphI*



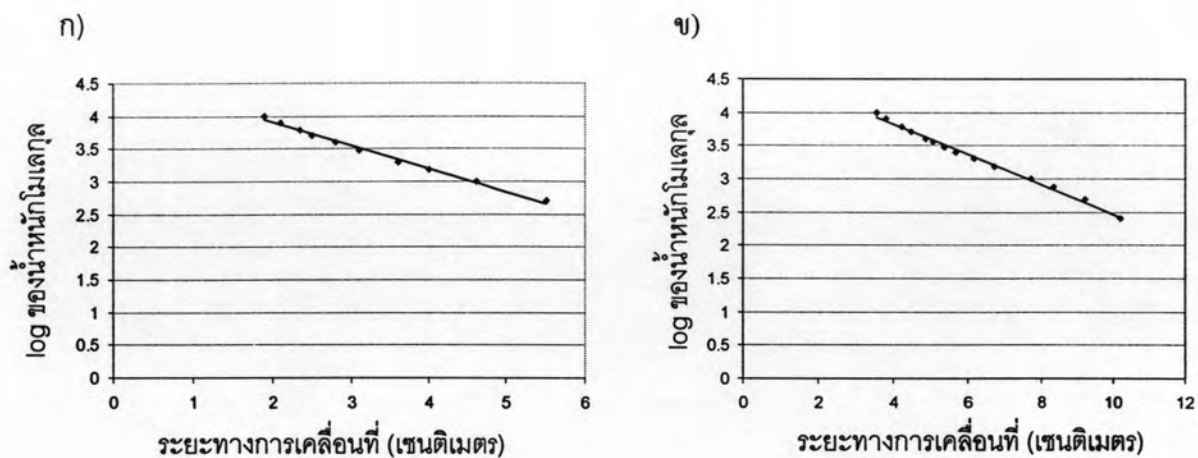
รูปที่ ๑.2 ภาพถ่าย 0.9% อะกาโรสเจล ช่องวิ่งที่ 1: 1 kb DNA ladder เข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร ภาพ ก) ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *EcoRV* ภาพ ข) ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *EcoRI* ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *EcoRV* และ *PstI* และภาพ ค) ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *BglII* และ *EcoRI* ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *BglII* และ *PstI*

2. กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอ

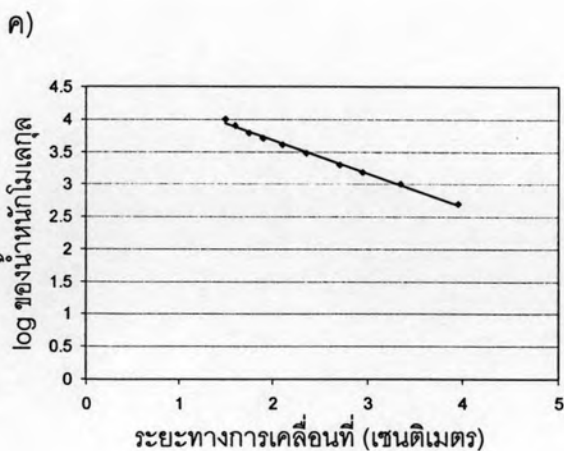
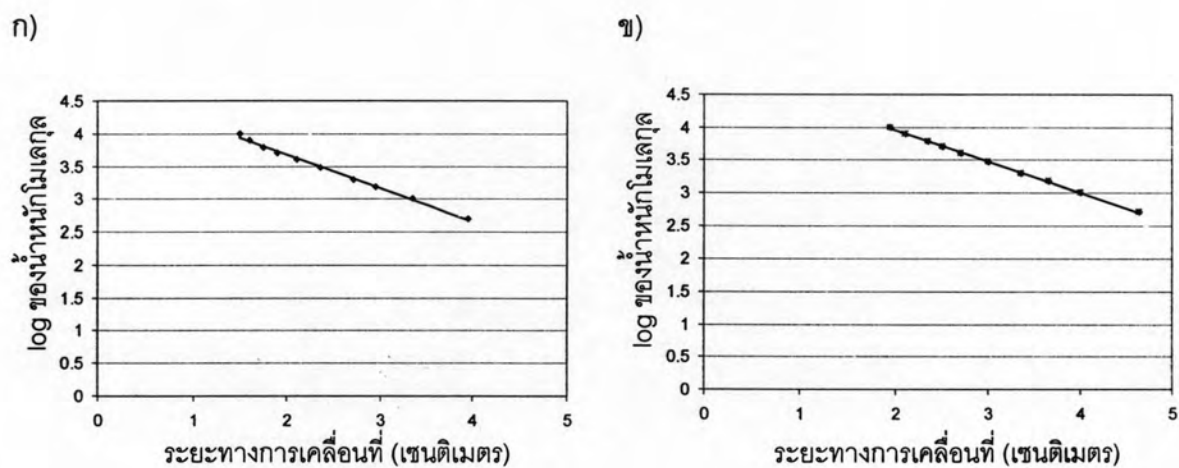
สร้างกราฟของดีเอ็นเอมาตรฐานจากการทดลองในรูปที่ ๑.1 และ ๑.2 โดยสร้างกราฟระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะการเคลื่อนที่บนอะกาโรสเจล ดังแสดงในรูปที่ ๑.3 และ ๑.4 ซึ่งสามารถคำนวณค่าความเชื่อมั่นและสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ ๑.1

ตารางที่ ๑.1 แสดงค่าความเชื่อมั่นและสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานที่คำนวณได้จากรูปที่ ๑.3 และ ๑.4

กราฟที่	ค่าความเชื่อมั่น(%)	สมการเส้นตรง
3ก	99.33	$y = -0.3551x + 4.6159$
3ข	99.26	$y = -0.2254x + 4.7181$
4ก	99.45	$y = -0.5129x + 4.7021$
4ข	99.91	$y = -0.4745x + 4.899$
4ค	99.86	$y = -0.5738x + 4.8837$



รูปที่ ๑.3 กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอในการทดลองรูปที่ ๑.1



รูปที่ ๑.4 กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอในการทดลองรูปที่ ๑.2

ภาคผนวก จ

แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ pPC1

1 GAATTCTGCA CGGCCTTCTG GTCGAGCGGC GCGGTATGCG GTCCCAACCC
 51 GGTGATCGCT TTGCGTGATG CCGTGCGCA GGCCAAGACG TCAGGCGATT
 101 GGAGCAAGGC CGAAGAGCTG ACCGGCGCGA TGGCACAGAC CTATCAGACG
 151 CTCTTTCCGC AGGGCTCGTT CAAGGTCTTT TCTTCCTATA ACATCCCGCT
 201 CGAAAAGGCG CCGATGGATG CCGCAGGATG GATGAAGGCT GGTCCCTGTC
 251 GTCCGCCCTA CAACATTGTT CCCGAGGATT ATCTCGAAGG CGGGCGCGAG
 301 TCCGGGCGGC GTTGGGCAA ACTTCACAAG AGCTTGGCGT AAGGCGCGAG

orf1

M E Q R T K M I D F F F D F M S
 351 TGATGGAGCA GCGGACCAAG ATGATCGATT TCTTTTTCGA TTTTCATGAGC

P F A Y L A H S Q L P E L A R K H
 401 CCGTTTGCC ATCTGGCGCA TAGCCAATTG CCGGAGCTTG CGCGCAAGCA

G Y E L R Y R P I D L P A A K L
 451 CGGTTATGAA CTGCGCTATC GCCCGATCGA TCTGCCTGCG GCCAAGTTGG

A A G N T G P P N V S M P I K L R
 501 CTGCAGGCAA TACCGGTCCG CCCAATGTGT CGATGCCTAT CAAGTTGCGC

Y L R K D L D R W A E R Y K I P I
 551 TATCTGCGTA AGGATCTCGA TCGCTGGGCT GAGCGGTACA AGATCCCGAT

S F P P S L K S E L A N K G V F
 601 CTCCTTTCTT CCATCCCTGA AGTCGGAGCT GGCCAATAAG GCGGTGTTTT

F A E A K G Q C K D Y V R H V W S
 651 TCGCCGAGGC CAAGGGGCG TGCAAGGATT ATGTCCGCCA TGTTTGGTCC

H S W G E G Q D M S S E E L L A E
 701 CATTCTGGG GTGAGGGGCA GGACATGTCG AGCGAGGAGC TGCTGGCTGA

I A S E L G W E P D A F L A Y V
 751 GATTGCGAGC GAGCTGGGGT GGGAGCCAGA TGCTTTTCTC GCCTATGTTT

H S E E A E D A Y R L S N E E A H
 801 ACTCCGAAGA AGCCGAAGAT GCCTACCGAT TAAGCAATGA AGAAGCGCAT

S R G V F G A P I M M I G E E M W
 851 TCGCGCGGCG TATTCGGGCG GCCGATCATG ATGATTGGCG AGGAAATGTG

W G S D R L F F L D E Y L S S Q
 901 GTGGGGGAGC GACCGATTGT TCTTCCTTGA TGAATATCTA TCGAGCCAGT

รูปที่ จ.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pPC1 ซึ่งมีขนาด 4,624 เบส โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น และบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้นเป็นตำแหน่งโคดอนหยุด โดยระบุชื่อยีนที่บริเวณเริ่มต้น *orf* และ *orf5* ไม่พบบริเวณโคดอนหยุด

arhA1

*
 M D D L I D T K

951 GAAAAATTGA AATAAGGATT TATGCAATGG ATGACCTGAT CGACACCAAG

R G L Q S A S M F I D P H L Y E V

1001 CGTGGTTTGC AATCCGCCAG TATGTTTCATC GATCCACATC TTTATGAGGT

E M E K I F G R C W L F L T H E

1051 GGAGATGGAG AAGATTTTCG GCCGTTGCTG GCTCTTTCTC ACTCATGAGT

S A I P N Y G D F V T A K M G E D

1101 CGGCCATTCC GAATTATGGC GACTTTGTTA CTGCGAAAAT GGGCGAAGAC

E V L V V R Q E D G T V K A F L N

1151 GAAGTCCTCG TGGTTCGCCA AGAGGACGGA ACGGTCAAGG CCTTTCTCAA

V C R H R G A R V C P V E A G N

1201 TGTCTGTCGG CACCGCGGTG CTCGCGTATG CCCTGTCGAG GCGGGGAACC

R R A F V C N Y H G W S Y A A D G

1251 GGCCTGCCTT CGTCTGCAAC TATCACGGGT GGTCTACGC CGCCGATGGG

S L A A I P F E K E L Y G G K I D

1301 TCATTGGCGG CCATCCCCTT CGAGAAGGAG CTTTATGGCG GCAAGATCGA

R C A H G L K E V A K V D S Y R

1351 CCGCTGCGCG CACGGTTTGA AAGAGGTGGC AAAGGTTGAT AGCTATCGCG

G F L F G N F D P G A I S L E D Y

1401 GCTTCCTGTT CGGCAATTTT GATCCAGGGG CGATCTCGCT TGAAGACTAT

L G D V R W Y L D I W M E A S G G

1451 CTGGGCGATG TCCGCTGGTA TCTGGATATC TGGATGGAAG CGAGCGGGGG

V E L I G P P A R S I V H C N W

1501 TGTGGAAGT ATCGGTCCGC CGGCGCGCTC GATCGTTCAT TGCAACTGGA

K A P T E N F V G D A Y H I G W T

1551 AAGCGCCGAC TGAAAATTTT GTTGGTGATG CCTATCACAT TGGGTGGACT

H A S S L A A S R S I F A P M S G

1601 CATGCTTCCT CTTTGGCGGC GAGCCGTTTCG ATTTTCGCCC CGATGTCGGG

N Q M L P P A G A G A Q I A T R

1651 AAATCAAATG CTGCCCCCG CAGGGGCTGG TGCGCAGATT GCAACGCGCT

F G H G L G I L Y D V N P G V H T

1701 TTGGCCACGG GCTGGGCATT CTTTACGATG TCAATCCGGG CGTCCACACC

A Q M A E K I L A W Q A T K K D K

1751 GCGCAGATGG CCGAGAAAAT CCTGGCCTGG CAGGCCACGA AAAAGGACAA

รูปที่ ๑.1 (ต่อ) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pPC1 ซึ่งมีขนาด 4,624 เบส โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น และบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้นเป็นตำแหน่งโคดอนหยุด โดยระบุชื่อยีนที่บริเวณเริ่มต้น *orf* และ *orf5* ไม่พบบริเวณโคดอนหยุด

I A E K Y G E L K A R F Y G S H
1801 GATCGCGGAG AAATACGGGG AGCTCAAGGC ACGTTTCTAC GGTTCGCATC

L N G S L F P N V S Y L W G T N T
1851 TCAACGGTTC GTTGTTCCTG AATGTTTCTT ACCTTTGGGG GACCAACACG

L K I W Q P R G P S E T E V W T W
1901 TTGAAGATCT GGCAGCCGCG TGGTCCGAGC GAGACGGAAG TTTGGACCTG

A M A E K D M P E D L K R D I Y
1951 GGCGATGGCG GAAAAGGATA TGCCCAGGGA TCTGAAGCGG GACATTTACA

N G L H G S F G T A G Y W E A D D
2001 ACGGCCTACA CGGAAGCTTC GGAACCGCAG GCTACTGGGA AGCTGACGAC

N D N M E S A S L L P T G W Q S R
2051 AACGACAACA TGAATCGGC TTCGCTTCTT CCGACAGGTT GGCAGTCGCG

K L R L N A Q M G I G N D T V M
2101 CAAGTTGCGA CTCAACGCC AGATGGGGAT CGGCAACGAC ACGGTGATGG

D E M P G V I G Q A A I G E T S Y
2151 ACGAAATGCC CGGCGTGATC GGCCAGGCGG CGATCGGCGA AACGTCTTAC

R G Y Y R F Y D E I L K L P S W D
2201 CGCGGATACT ACCGCTTTTA TGACGAGATC CTGAAGCTTC CTTCTTGGGA

A F D L N D E G W K Q Q L I D A
2251 TGCTTTCGAT CTGAATGACG AGGGATGGAA GCAGCAATTG ATCGACGCCG

D R * arhA2
2301 ATCGCTGATC ATCCCTTTGC AAAATCTAGG TTTTCAGGAT GCTATAAAAAT
M

E N A N Q I V K T M G A D V W D
2351 GGAAAACGCA AATCAAATCG TCAAAAACGAT GGGCGCGGAT GTATGGGATG

G D P E L I A D H D L L H R V Q A
2401 GCGATCCGGA GCTGATCGCC GATCACGATC TGCTTCACAG GGTGCAGGCT

F T N R E A R L L D T G R V R E W
2451 TTCACCAATC GCGAAGCGAG GTTGCTCGAT ACCGGGCGGG TGCGGGAATG

L D E M I H P D I R Y V I I S R
2501 GCTCGACGAG ATGATCCATC CCGACATTCT TTATGTCATA ATCAGCCGAC

Q L R Y I E E R R Y L P P D S V F
2551 AGCTGCGATA CATCGAAGAG CGTCGCTATT TGCCGCCCGA CAGCGTTTTC

I Y D D D H G A L N A R V E Q Q L
2601 ATCTACGACG ATGATCACGG TGCGCTCAAT GCACGTGTGG AGCAGCAGTT

รูปที่ ๑.1 (ต่อ) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pPC1 ซึ่งมีขนาด 4,624 เบส โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น และบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้นเป็นตำแหน่งโคดอนหยุด โดยระบุชื่อยีนที่บริเวณเริ่มต้น orf และ orf5 ไม่พบบริเวณโคดอนหยุด

H P Q N W R I N P R E A Y V R I
 2651 GCATCCGCAG AATTGGCGCA TCAATCCACG CGAGGCTTAT GTGCGGATCG

 G T N L E V T K G S A K D R L F V
 2701 GCACAAACCT CGAGGTTACC AAAGGTAGCG CAAAAGACAG GCTTTTCGTG

 R T N W H L R R M R R Q Y Q I D D
 2751 CGGACGAATT GGCACCTTCG TCGCATGCGT CGGCAGTATC AGATCGACGA

 F I Y S R H D E L V I T P D Q G
 2801 TTTTATCTAT TCCCGACAG ACGAGCTGGT CATCACCCCG GATCAGGGGT

 F K F V K R F I A F A E R G V Q G
 2851 TCAAGTTCGT GAAGCGCTTC ATTGCGTTCG CGGAGCGCGG TGTGCAGGGC

 R N M T L F L *
 2901 CGTAATATGA CGCTGTTCTT GTAAGCGCCT GGCATAAAGC AAGAAATCTG
 2951 TCGGCTCGAC TTTGTTTGAG CGCTGGGTGCG GCGTGCGGAT CAAGGAGGAC
 3001 AAGAATGGGT TGGTTGGAAG GTAAGATTGC GTTGATGAGG AGAACGCGGC
 3051 ACCGACGACG GGCATCATCA TCAATACCGA TGGCGGCCTT GGCATGCGGG
 3101 GTATCATGAA CGTCAATGGC GGCAGCAGAG TCGAGATCTG AGCGCAGACG

orf4
 M R I C R F N T D R V
 3151 CACAGAGAGG CGGAGCAGAT GAGAATCTGC AGGTTCAATA CGGATCGGGT

 G I V E G D E V F D V S G A L A
 3201 CGGGATCGTT GAGGGCGATG AAGTTTTCGA CGTCAGCGGG GCATTGGCTT

 C L P D S R W P F P Q K D I F I A
 3251 GCCTTCCCGA CAGCCGCTGG CCGTTTCCGC AAAAGGACAT ATTCATCGCG

 E L A R L L P L M S E L K E Q A T
 3301 GAGCTTGCAC GATTGCTCCC GCTCATGTGCG GAATTGAAGG AACAGGCCAC

 P T P I T D V R L E A P V A N P
 3351 GCCCAGCCG ATCACGGATG TCCGGCTCGA AGCCCCTGTC GCCAACCCAT

 S K L I N A P I N Y R A H I E E T
 3401 CGAAGCTGAT CAACGCGCCG ATCAATTATC GCGGCACAT CGAGGAAACG

 A A N Q E I A H G R D M T K S I W
 3451 GCGGCAACC AGGAAATTGC CCATGGTTCGC GACATGACCA AAAGCATCTG

 Q W G L F L K A N S A L S G A G
 3501 GCAGTGGGGG CTGTTCTTAA AGGCCAACAG CGCCCTTCC GGGGCTGGCG

 E P I R L R Y P G R R I D H E I E
 3551 AACCTATCCG CCTGCGTTAT CCAGGGCGCA GGATCGATCA TGAGATCGAA

รูปที่ ๑.1 (ต่อ) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pPC1 ซึ่งมีขนาด 4,624 เบส โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น และบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้นเป็นตำแหน่งโคดอนหยุด โดยระบุชื่อยีนที่บริเวณเริ่มต้น *orf* และ *orf5* ไม่พบบริเวณโคดอนหยุด


```

      L A V I I G T Q C H G V T R D E A
3601 CTTGCGGTGA TCATCGGCAC ACAGTGCCAC GGTGTGACGC GCGATGAGGC

      L K Y V A G Y T V G L D I T I R
3651 CCTGAAATAT GTGGCGGGCT ATACGGTCCG ATTGGACATC ACCATCCGGG

      G P E L Q S F R K S A D S F A V L
3701 GGCCGGAAct GCAAAGTTTC CGCAAGTCGG CTGATAGCTT TGCGGTGCTT

      G P W M V T A D E I D D P G C L G
3751 GGCCCGTGGa TGGTCACAGC GGACGAGATT GACGATCCGG GGTGTCTCCG

      L E L R V N G Q I R Q K A N T R
3801 CCTGGAATTG CGGGTCAACG GCCAGATTTC TCAAAAGGCC AACACCCCGC

      D L V Y D V P K L I E Y A S S M Y
3851 ATCTTGTCTA CGACGTTCCC AAGCTGATCG AATACGCCCTC CTCGATGTAT

      Q L N P G D V I F T G T P E G V G
3901 CAACTCAATC CTGGCGATGT CATT TTTACT GGCACGCCGG AAGGAGTCGG

      P I E A G D R I E A R I S E I G
3951 GCCCATCGAA GCGGGAGATA GGATCGAGGC GAGGATCAGC GAGATCGGGC

      E L R V D V A P E I V A L P R H D
4001 AATTGCGCGT CGATGTGGCT CCTGAAATTG TCGCGCTTCC GCGACACGAT

                                     orf5
      P V L E E M Q C * M I V Q V
4051 CCTGTTCTCG AGGAAATGCA ATGCTGAAAT CGGCATGATC GTCCAAGTCA

      K P I R R I V Q C D E G E G L L D
4101 AACCGATACG CAGGATCGTG CAATGCGACG AAGGCGAAGG GTTGCTCGAC

      V L L R E G L P I S Y S C K T G N
4151 GTGCTTCTTC GGAAGGTCT GCCCATTTCT TACAGCTGCA AGACCGGCAA

      C G M C E V E P F D L F A P D R
4201 TTGCGGTATG TGCGAGGTGG AACCTTTCGA TCTGTTTGGC CCCGATCGCC

      H K Q S V L M Q K N K A F L A C Q
4251 ACAAGCAGTC TGTCCTGATG CAGAAGAACA AGGCCTTCTT TGCCTGCCAA

      R N I S M D M G V R L P S V R P A
4301 AGAAACATCT CGATGGACAT GGGGGTGCCT CTCCATCCG TCAGACCGGC

      V N V P F Q Y H R G R I T A L E
4351 GGTGAACGTC CCCTTCCAGT ATCATCGCGG CCGGATCACT GCTCTTGAAG

      E I E T N V I Q F D F D I G R R P
4401 AGATAGAGAC CAACGTCATC CAGTTTGACT TCGATATCGG GCGAAGGCCG

```

รูปที่ ๑.1 (ต่อ) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pPC1 ซึ่งมีขนาด 4,624 เบส โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น และบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้นเป็นตำแหน่งโคดอนหยุด โดยระบุชื่อยีนที่บริเวณเริ่มต้น *orf* และ *orf5* ไม่พบบริเวณโคดอนหยุด

```

      A R F F P G Q K Y A L S M D R G R
4451 GCGCGTTTT TCCAGGGCA GAAATATGCT CTTCCATGG ATCGGGGGCG

      S P L L F P A N A P G Q S T L S
4501 CTCCCCTCTC CTGTTTCCCG CCAATGCACC TGGTCAGTCG ACCCTGAGCT

      F L V E A D T E P Q F L V E L K K
4551 TCCTTGTCGA AGCAGACACA GAGCCACAGT TCCTTGTTGA ATTGAAGAAG

      G I S A G Q E F
4601 GGGATATCCG CCGGGCAGGA ATTC

```

รูปที่ ๑.1 (ต่อ) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pPC1 ซึ่งมีขนาด 4,624 เบส โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น และบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้นเป็นตำแหน่งโคดอนหยุด โดยระบุชื่อยีนที่บริเวณเริ่มต้น orf และ orf5 ไม่พบบริเวณโคดอนหยุด

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกรรณกาญจน์ สายพิน เกิดเมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 และเข้ารับการศึกษาคณะปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547