

เอกสารอ้างอิง



1. Kooni, K., and Surang, D., "Review *Pseudomonas pseudomallei* and Melioidosis, with special reference to the status in Thailand," Japan J. Med. Sci. Biol., 41, 123-157, 1988.
2. Patamasucon P. National Workshop on Melioidosis organized by the infectious disease association of Thailand at Ambassador Hotel, Bangkok, Thailand, 23-24, November, 1985. Bangkok: Infectious Disease Association of Thailand, 1985.
3. Patamasucon, P., U.B. Schaad, and J.D. Nelson. "Medical progress : Melioidosis," J. Pediatr., 100, 175-182, 1982.
4. Howe, C., Sampath, A., and Spotnitz, M., "The *Pseudomallei* Group : A review.," J. Infect. Dis., 124, 598-606, 1971.
5. Kanai, K., and Dejsirilert, S., "Review *Pseudomonas pseudomallei* and Melioidosis, with special reference to the status in Thailand, " Japan J. Med. Sci. Biol., 41, 123-157, 1988.
6. Piggott, J.A., and Hochholzer, L., " Human Melioidosis," Arch. Pathol., 90, 101-111, 1970.
7. Redfearn, M.S., "Toxic lysolipoid : isolation from *Pseudomonas pseudomallei*," Science, 164, 648-649, 1964.
8. Heckly, R.J., "Differentiation of exotoxin and other biologically active substances in *Pseudomonas pseudomallei* filtrates," J. Bacteriol., 88, 1730-1736, 1964.

9. Ashdown, L. R., and Koehler, J.M., "Production of hemolysin and other extracellular enzymes by clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*," J.Clin. Micro., 28 (10), 2331-2334, 1990.
10. Nigg, C.R., Heckly, R.J., and Colling, M., "Toxin produced by *Malleomyces pseudomallei*," Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 89, 17-20, 1955.
11. Lertpocasonbat., K., "Isolation and some properties of a protease from *Pseudomonas pseudomallei*," (Master 's Thesis, Chulalongkorn university, 1990), 4-17.
12. Angelika, N, Ursula, R., and Werner, G., "Determination of the functions of hemolytic plasmid pHLy 152 of *Escherichia coli*," J. Bacteriol., 145 (1), 233-247, 1981.
13. Hughes, C., Muller, D., Hacker, J. and Goebel, W., "Genetics and pathogenic role of *Escherichia coli* hemolysin," Toxicon, 20, 247-252, 1982.
14. Indrani, K., Iddya, K., Malathi, G.R., and Nayesha, C.N., "Haemolysins of *Vibrio parahaemolyticus* strains passaged in mice," Indian J. Med. Res., 89, 376-380, 1989.
15. Smith, C.J., "Thiol-activated (oxygen-labile) cytolysins," Bacterial toxins and cell membranes (Jelaszewicz, J. eds pp., 129-83, Academic Press, London., 1978.
16. Youngman, P., Connelly, P. and Portnoy, D.A., "Bacillus subtilis expressing haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells," Nature, 345, 175-176.

17. Nigg, C., "Serological studies on subclinical melioidosis," J. Immunol., 91, 18-28, 1963.
18. Leelarasamee, A., and Boromkitti, S., "Melioidosis Review and Update," Review of infectious disease, 11(3),413-425, 1989.
19. Dannenberg, A.M., Jr., and Scott, E.A., "Melioidosis : pathogenesis and immunity in mice and hamster " 1 studies with virulent strains of *Malleomyces pseudomallei*," J.Exp.Med. 107,153-166, 1958.
20. Liu, P.V., "Survey of hemolysin production among species of Pseudomonads," J.Bacteriol. 74,718-729, 1957.
21. Rapaport, F.T., Millar, J.W., and Ruch,J., "Endotoxic properties of *Pseudomonas pseudomallei*," Arch.Path., 71,424-436, 1961.
22. Lian, C.J., Rosendal,S.,and MacInnes, J.I., "Molecular cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*," Infect. Immun., 57,3377-3382, 1989.
23. Vasil, M.L., Berka, R.M., Gray, G.L., and Nakai,H., "Cloning of a phosphate regulated hemolysin gene (Phospholipase C) from *Pseudomonas aeruginosa*," J.Bacteriol. 152,431-440, 1982.
24. Uphoff,T.S.and Welch,R.A., "Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium-independent hemolysin genes (hpn A and hpn B) reveals sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (shl A and shl B), " J.Bacteriol. 172,1206-1216, 1990.

25. Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J.M., and Holland, B., "*Escherichia coli* Hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores," Infect. Immun. 52,63-69, 1986.
26. Canicatti, C., "Hemolysins pore-forming proteins in invertebrates," Experientia. 46,239-244, 1990.
27. Chakraborty, T., Kathariou, S., Hacker, J., et.al., "Molecular analysis of bacterial cytolysins," Review. Infect. Diseases. 9,5456-5466, 1987.
28. Hughes, C., Hacker, J., Roberts, A., and Goebel, W., "Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic Urinary Tract Infections caused by *Escherichia coli.*," Infect. Immun. 39, 546-551, 1983.
29. Colling, M., Nigg, C., and Heckly, R.J., "Toxins of *Pseudomonas pseudomallei*," J.Bacteriol. 76, 422-426, 1958.
30. Gadederg, O.V., Orskov, I., and Rhodes, J.M., "Cytotoxic-effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes In Vitro," Infect. Immun. 41,358-364, 1983.
31. Chakraborty, T., Bergbauer, H., Huhle, B., and Goebel, W., "Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12." 67,368-374, 1986.

32. Yasuyoshi, I., Hashimoto, H., and Clewell, D.B., "High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections, " J.Clin.Micro. 25, 1524-1528, 1987.
33. Hacker, J., Hughes, C., Hof, H., and Goebel, W., "Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause Urinary Tract Infection determinant different levels of toxicity in mice, " Infect. Immun., 42,57-63, 1983.
34. Haynes, W.C. and Burkholder, H., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology : Breed R.S., Murray E.G.P., and Smith, N.R., (Eds) p100, The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 7 th ed., 1957.
35. Peerbooms, P.G.H., Marian J., A., Verweij, J., and Maclaren, D.M., "Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*," Infect. Immun. 43,1068-1071, 1984.
36. Kume, K., Nakai, T., and Sawata, A., "Interaction between heat-stable hemolytic substance from *Haemophilus pleuropneumoniae* and porcine pulmonary," Infect. Immun., 51,563-570, 1986.
37. Wray, S.K., Hull, S.I., Cook, R.G., Barrish, J., and Hull, R.A., "Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolated of *Proteus mirabilis*," Infect. Immun. 54,43-49, 1986.

38. Falcioni, G.C., Coderoni, S., Tedeschi, G.G., Brunori, M., and Rotilio, G., "Red cell lysis induced by microorganisms as a case of superoxide- and hydrogen peroxide-dependent hemolysins mediated by oxyhemoglobin," Biochim. Biophys. Acta., 678,437-441, 1981.
39. Felmler, T., Pellett, S., and Welch, R.A., "Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin," J. Bacteriol., 163, 94-105, 1985.
40. Hartlein, M., Hughes, C., Miller, D., Kreft, J., and Goebel, W., "Haemolysin genes from Gram-negative and Gram-positive bacteria," 39-46, In J.E., Alonf, F.J., Fehrenbach, J.H., Freer, and Jeljaszewicz, J., "Bacterial protein toxin," FEMS symposium no 24, Academic Press London.
41. Welch, R.A., Hull, R., and Falkow, S., "Molecular cloning and physical characterization of a chromosome hemolysin from *Escherichia coli*," Infect. Immun., 42,178-186, 1983.
42. Welch, R.A., Dellinger, E.P., Minshew, B., and Falkow, S., "Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *Escherichia coli* infections," Nature, 294,665-667, 1981.
43. Wagner, W., Vogel, M., and Goebel, W., "Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions," J. Bacteriol., 154,200-210, 1983.

44. Hess, J., Wels, W., Vogel, M., and Goebel, W., "Nucleotide sequence of a plasmid-encoded hemolysin determinant and its comparison with a corresponding chromosome hemolysin sequence." FEMS Letters, 34,1-11, 1986.
45. Lior, H. and Johnson, W.M., "Application of the polymerase chain reaction (PCR) to detection of the aerolysin gene in whole cell cultures of α -hemolytic *Aeromonas hydrophila*," Experientia, 47,421-4,1991.
46. Walker, J.A., Allen, R.L., Falmagne, P., Johnson, M.K., and Boulnois, G.J., "Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*," Infect. Immun. 55, 1184-1189, 1987.
47. Frederick, M., Roger, B., and Robert, K., Current protocols in molecular biology Vol 1 and Vol 2. Canada Publishing Co., 1990.
48. Jingdong, Z., Walter, K., Doninique, V., and Walter, F., "A method for fast and pure DNA elution from agarose gels by centrifugal filtration," Bio /technology, 3,1014-1016, 1985.
49. Goldberg, S.L., and Murphy, J.R., "Molecular cloning of the hemolysin determinant from *Vibrio cholerae* EL Tor," J. Bacteriol. 160, 239-244, 1984.
50. Iida, T., and Yanamoto, K., "Cloning and expression of two genes encoding highly homologous hemolysins from a Kanayawa-phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* T4750 strain," Gene, 93,9-15,1990.

51. Richardson, K., Michalski, J., and Kaper, J.B., "Hemolysin production and cloning of two hemolysin determinants from classical *Vibrio cholerae*," Infect. Immun., 54, 415-420, 1986.
52. Kehoe, M., Duncan, J., Foster, T., Fairweather, N., and Dougan, G., "Cloning, expression and mapping of the *Staphylococcus aureus* α -hemolysin determinant in *Escherichia coli* K1-12," Infect. Immun., 41, 1150-1111, 1983.
53. Wright, A.C., Morris, J.G., Manevel, D.R., Richardson, K., and Kaper, J.B., "Clon of the cytotoxin-hemolysin gene of *Vibrio vulnificus*," Infect. Immun., 50, 922-924, 1985.
54. Coleman, K., Dougan, G., and Arbuthnott, J.P., "Cloning, and expression in *Escherichia coli* K-12, of the chromosomal hemolysin (Phospholipase C) determinant of *Pseudomonas aeruginosa*," J. Bacteriol., 153, 909-915, 1983.
55. Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F., Molecular Cloning : laboratory manual Cold. Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2nd ed., 1989.
56. Bohach, G.A., and Snyder, I.S., "Chemical and immunological analysis of the complex structure of *Escherichia coli* alpha-hemolysins," J. Bacteriol., 164 (3), 1071-1080, 1985.
57. Bruce, L.G., and Stuart, C.F., "Restriction mapping of recombinant DNA molecules using pulsed field gel electrophoresis," Anal. biochem., 191, 70-74, 1990.

58. Nigg, C., Heckly, R.J., and Colling, M., "Toxin produced by *Malleomyces pseudomallei*," P.S.E.B.M., 89, 10-20, 1955.
59. Dance, D.A.B., White, N.S., Suputtamongkol, Y., Wattanagoon, Y., Wuthiekanui Y., and Chaowagul, W., "The use of bone marrow culture for the diagnosis of melioidosis," Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hygiene., 84, 585-587, 1990.
60. Fairweather, N., Kennedy, S., Fuster T.J., Kohoe, M., and Dougan, G., "Expression of a cloned *Staphylococcus aureus* α -hemolysin determinant in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*," Infect. Immun., 41, 1112-1117, 1983.
61. Goebel, W., and Hedgpeth, J., "Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*," J. Bacteriol., 153, 1290-1298, 1982.
62. Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., et.al. "Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance," Nature, 324, 485-489, 1986.
63. Goldberg, S., and Murphy, J.R., "Cloning and characterization of the hemolysin determinants from *Vibrio cholerae* RV 79 (HLY +), RV 79 (HLY -), and 569 B," J. Bacteriol., 162, 35-41, 1985.
64. Ismail, G., Embi, M.N., Omar, O., Allen, J.C., and Smith, C.J., "A competitive immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin," J. Med. Microbiol., 23, 353-357, 1987.

65. Jonsson, P., Lindberg, M., Haraldsson, I, and Wadstrom, T., "Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model : studies of alpha hemolysin, Coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning, " Infect. Immun., 49,705-769, 1985.
66. Vasil, M.L., Krieg, D.P., Kuhns, J.S., et.al., "Molecular analysis of hemolytic and Phospholipase C activities of *Pseudomonas cepacia*," Infect. Immun. 58,4020-4029, 1990.
67. Maj, J.A.P., and Hochholzer, L., "Human Melioidosis ," Arch.Path. 90, 101-100, 1970.
68. Manning, P.A., Brown, M.H., and Heuzenroeder, M.W., "Cloning of the structural gene (hly) for the haemolysin of *Vibrio cholerae* EL Tor strain 071," Gene, 31,225-231, 1984.
69. Clinkenbeard, K.D., and Thiessen, A.E., "Mechanism of action of *Moraxella bovis* hemolysin, " Infect. Immuno., 59, 1148-1152, 1991.
70. Pritchard, A.E., and Vasil, M.L., "Nucleotide sequence and expression of a *Pseudomonas aeruginosa*," J.Bacteriol. 167,291-298, 1986.
71. Pattee, P.A., "Chromosomal map location of the alpha-hemolysin structural gene in *Staphylococcus aureus* NCTC 8325," Infect. Immun., 54, 593-596, 1986.
72. Real, G.D., Segers, R.P.A., Zeijst, M., and Gaastra, W., "Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardju," Infect. Immun. 57,2563-2590, 1989

73. Rodneg, A.W., "Identification of two different hemolysin determinants in Uropathogenic *Proteus* isolates, " Infect. Immun., 55, 2183-2190, 1987.
74. Valvano, M.A., Silver, R.P. and Crosa, J.H., "Occurrence of chromosome- or plasmid-mediated Aerobactin iron transport systems and hemolysin production among clonal groups of human invasive strains of *Escherichia coli* K1, " Infect. Immun., 52, 192-199, 1986.
75. Welch, R.A., and Falkow, S., "Characterization of *Escherichia coli* hemolysins conferring quantitative differences in virulence, " Infect. Immun., 43, 156-160, 1984.
76. Waalwijk, C., Bosch, J.F., Maclaren, D.M., and Graaff, J., "Hemolysin plasmid coding for the virulence of a nephropathogenic *Escherichia coli* Strain," Infect. Immun., 35, 32-37, 1982.
77. Smith, D.B., and Johnson, K.S., "Single-step purification of polypeptides expressed on *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase ," Nature. 67, 31-40, 1988.
78. Kehoe, M.A., Miller, L., Walker, J.A., and Boulnois, G.J., "Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) Gene : structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins," Infect. Immun., 55(12), 3228-3232, 1987.
79. Kado, C.I., and Liu, S.T., "Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, " J. Bacteriol., 145, 1365-1373, 1981.

80. Kehoe, M., and Timmis, K.N., "Cloning and expression in *Escherichia coli* of the streptolysin O determinant from *Streptococcus pyogenes*: characterization of the cloned Streptolysin O determinant and demonstration of the absence of substantial homology with determinants of other thiol-activated toxins," Infect.Immun. 43,804-810, 1984.
81. Ostroff, R.M., Wretling, B., Vasil, M.L., "Mutations in the Hemolytic - Phospholipase C operon results in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 grown under phosphate-limiting conditions," Infect.Immun. 57,1369-1373, 1989.
82. Vasil, M.L., Chamberlain, C., and Grant, C.C.R., "Molecular studies of *Pseudomonas* Exotoxin A gene," Infect.Immun. 52,538-548, 1986.
- 83 Scordilis, G.E. Ree, H., and Lessie, T.G., "Identification of transposable elements which activate gene expression in *Pseudomonas cepacia*," J.Bacteriol. 169,8-13, 1987.
84. Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L., "Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic Phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*," J.Bacteriol. 172,5915-5923, 1990.
85. Deininger, P., and Smith, W., "A Rapid screening procedure for the Identification of recombinant bacterial clones," Biotech. 5, 11-13, 1987.

86. Barclay, R., Threlfall, D.R., and Leighton, I., "Separation and properties of the haemolysins and extracellular enzymes of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*," J. Med. Microbiol., 30, 119-127, 1989.
87. Albesa, I., "Klebsiella pneumoniae haemolysin adsorption to red blood cells," J. Appl. Bact., 67, 263-266, 1989.
88. Bjorksten, B., and Kaijser, B., "Interaction of human serum and neutrophils with *Escherichia coli* strain: differences between strains isolated from urine of patients with pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria," Infect. Immun., 22, 308-311, 1978.
89. Cowell, J.L., Grushoff-kosyk, P.S., and Bernheimer, A.W., "Purification of cereolysin and the electrophoretic separation of the active (reduced) and inactive (oxidized) forms of the purified toxin," Infect. Immun., 144-154, 1976.
90. Brown, T.A., Gene cloning an introduction, Chapman and Hall, London, 2nd ed., 1990.
91. Singer, B.S., Gold, L., "Phage T4 expression vector: protein from proteolysis," Gene, 106, 1-6, 1991.
92. Bukrinsky, M.I., Barsov, E.V., and Shilov, A.A., "Multicopy expression vector based on temperature-regulated lac repressor: expression of human immunodeficiency virus env gene in *Escherichia coli*," Gene, 70, 415-417, 1988.

93. Perron, C.Y., Vieira, J., and Messing, J., "Improved M 13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M 13 mp 18 and pUC 19 vectors, " Gene, 33, 103-119, 1985.
94. Lupski, J.R., and Weinstock, G.M., "Short, interspersed repetitive DNA sequence in Prokaryotic genomes, " J. Bacteriol., 174, 4525-4529, 1992.
95. Britten, R.J., and Kohne, D.E., " Repeated sequences in DNA, " Science, 161, 529-540, 1968.
96. Rapaport, F.T., Miller, W.J., and Ruch, J., "Endotoxin properties of *Pseudomonas pseudomallei*, " Arch. Pathol., 71, 429-436, 1961.
97. Yap, E.H., Chan, Y.C., Goh, K.T., et.al., "Sudden unexplained death syndrome—a new manifestation in melioidosis ?," Bacteriol. Infect., 107, 577-584, 1991.
98. Lusby, M., and Levine, H.B., "An intracellular mortality-enhancing material from *Malleomyces pseudomallei*, " J. Immunol., 80, 446-553, 1958.
99. Cavalier, S.J., Bohach, G.A., and Synder, I.S., " *Escherichia coli* α - hemolysin : characteristics and probable role in pathogenicity, " Microbial.Rev., 48, 326-343, 1984.

ภาคผนวก ก .

บัญชี สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

1. บัญชีและสารเคมี

Absolute ethanal	(Merck,Germany)
Agarose ultrapure	(Amresco,U.S.A.)
Ampicillin sodium salt	(Amresco, U.S.A.)
Beef extract	(Gibco, U.S.A.)
Bovine serum albumin	(Sigma,U.S.A.)
Chloroform	(Merck,German)
CTAB	(Amresco, U.S.A.)
Developer	(Kodak, Japan)
Dextrose	(Difco, U.S.A.)
DNA salmon sperm	(Sigma,U.S.A.)
Dithiothreitol (DTT)	(Amresco, U.S.A.)
Ethidium bromide	(Amresco, U.S.A.)
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	(Amresco,U.S.A.)
Ficoll (400-DL)	(Sigma,U.S.A.)
Fixer	(Kodak, Japan)
Formamide	(BRL,U.S.A.)
Glacial acetic acid	(Merck,Germany)
Glycerol	(Merck,Germany)
Isoamyl alcohol	(Merck,Germany)
Lambda DNA / Hind III	(BRL,U.S.A.)
Phenol	(BRL,U.S.A.)
Random Primer Labelling System	(BRL,U.S.A.)
Salmon sperm DNA	(Sigma,U.S.A.)

Sodium dodecyl sulfate	(Amresco,U.S.A.)
Sodium Hydroxide (NaOH)	(Merck,Germany)
Sodium chloride (NaCl)	(Merck,Germany)
Tris (ultrapure)	(Amresco,U.S.A.)
Trichloroacetic acid	(Sigma,U.S.A.)
Trisna-base	(Sigma,U.S.A.)
Tryptone	(Lab m,U.S.A.)
X-gal	(Amresco,U.S.A.)
ØX174/Hae III	(BRL,U.S.A.)

2. enzyme

Alkaline phosphatase (from unweaned calf intestinal mucosa) (CIP)	(Sigma,U.S.A.)
BamHI	(Gibco,U.S.A.)
BglI	(Gibco,U.S.A.)
BglIII	(Gibco,U.S.A.)
EcoRI	(Gibco,U.S.A.)
HindIII	(Gibco,U.S.A.)
HpaI	(Gibco,U.S.A.)
KpnI	(Gibco,U.S.A.)
ProtrinaseK	(Amresco,U.S.A.)
PstI	(Gibco,U.S.A.)
PvuII	(Gibco,U.S.A.)
RNaseA.	(Gibco,U.S.A.)
SalI	(Gibco,U.S.A.)
SmaI	(Gibco,U.S.A.)
SstI	(Gibco,U.S.A.)
StuI	(Gibco,U.S.A.)
T ₄ DNA ligase	(Gibco,U.S.A.)

3. วัสดุภัณฑ์และอื่น ๆ

<i>E. coli</i> JM109	(Gibco,U.S.A.)
Fuji X-ray film	(Fuji,Japan)
Hybridization bag	(BRL,U.S.A.)
Membrane filter 0.45 μ m	(RCM,U.S.A.)
Millipore membrane 0.22 μ m type GS	(Millipore,U.S.A.)
Polaroid film type 667	(Berlijucker,U.S.A.)
Pre-cut sheet of porous cellophane	(Flexel,U.S.A.)
Photo Gene TM nylon membrane	(BRL,U.S.A.)

4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

Microcentrifuge	(Fotodyne,U.S.A.)
Horizon 58 horizontal gel electrophoresis system stacked on model 200 Power supply	(BRL,U.S.A.)
Liquid scintillation counter 1219 Rack Beta Spectral	(LKB,Finland)
Incubator type 80	(Memmert,Germany)
Spectrophotometer HITACHI U-200	(Hitachi,Japan)

ภาคผนวก ข .

สาร เคมีและวิธีการ เตรียม

1. 10% SDS pH 7.2

Sodium dodecyl sulfate	10 กรัม
เติมน้ำกลั่นลงจนให้ได้ปริมาตร	100 มล.
ปรับ pH ให้ได้ 7.2	

2. 10 X ligation buffer

	ความเข้มข้น
Tris HCl pH 7.6	0.5 M
MgCl ₂	100 mM
dithiothreitol	100 mM
bovine serum albumin	500 µg/mL

3. 10 x CIP dephosphorylation buffer

	ความเข้มข้น
ZnCl ₂	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Tris, HCl pH 8.3	100 mM

4. 0.5 M EDTA pH 8.0

disodium ethylene diamine

tetraacetate .2H₂Oz 186.1 กรัม

น้ำกลั่น 800 มล.

ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล.

ปรับ pH ให้ได้ 8.0

นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

5. 5M Potassium acetate pH 4.8

Potassium acetate 16.17 กรัม

เติมน้ำกลั่น 33 มล.

glacial acetic acid 30 มล.

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.

นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

6. 1 M Tris pH 7.4, 7.6, 8.0

Tris base 121.1 กรัม

เติมน้ำกลั่น 800 มล.

ปรับ pH เท่าที่ต้องการด้วย conc.HCl

ปริมาตร

pH 7.4 เติม conc.HCl 70 มล.

pH 7.6 เติม conc.HCl 60 มล.

pH 8.0 เติม conc.HCl 42 มล.

นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

7. 50X Tris-acetate buffer (TAE)

Tris base	242	กรัม
glacial acetic acid	57.1	มล.
500 mM EDTA pH 8.0	100	มล.
นํานํ้าให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที		

8. 5X Tris-borate buffer (TBE)

Tris base	54	กรัม
boric acid	27.5	กรัม
500 mM EDTA pH 8.0	20	มล.
นํานํ้าให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที		

9. Prehybridization solution

	ความเข้มข้น	
NaCl	0.9	M
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.06	M
Na ₂ EDTA·H ₂ O	0.006	M
Denhardt's solution	0.1 % (W/V)	
ปรับ pH ให้ได้	7.4	
SDS	1.0 % (W/V)	
denatured Salmon sperm DNA	200	g/mL
Formamide	50 % (V/V)	

10. Hybridization solution

	ความเข้มข้น	
NaCl	1.8	M
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.12	M
Na ₂ EDTA.H ₂ O	0.012	M
Denhardt's solution	0.2 %	(W/V)
ปรับ pH ให้ได้	7.4	
SDS	1.0 %	(W/V)
denatured Salmon sperm DNA	200	µg/mL

11. 1% Denhardt's solution (10 มล.)

Ficoll	0.1	กรัม
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	0.1	กรัม
BSA	0.1	กรัม
เค็มน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตร	10.0	มล.
กรองผ่านกระดาษกรอง	0.45	µm

12. Salmon sperm DNA (10 µg/mL)

Salmon sperm DNA	10	มก.
(Sigma type III sodium salt)		
เค็มน้ำกลั่นปลอดเชื้อ	1	มล.
ละลาย Salmon sperm DNA ที่อุณหภูมิห้อง	2-4	นาที
แล้ว shear DNA โดยกดผ่าน hypodermic needle หลาย ๆ ครั้ง		
คัม DNA ที่อุณหภูมิ 100 °C 10 นาที		

13. 100 % Trichloroacetic acid

Trichloroacetic acid	500	กรัม
ละลายในน้ำกลั่นลดเชื้อ	227	มล.

14. 20 SSC

3 M NaCl	175	กรัม
0.3 M Na ₂ citrate .2 H ₂ O	88	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 โดยใช้ 1M HCl

นำใบกาเหว่าปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

15. CTAB/NaCl Solution

(10 % CTAB, 0.7 M NaCl)

NaCl	4.1	กรัม
CTAB	10	กรัม
เติมน้ำกลั่นลดเชื้อ	80	มล.

ละลายส่วนผสมที่อุณหภูมิ 65 °C เติมน้ำจนครบ 100 มล.

อาหารเลี้ยงเชื้อ16. LB (Luria-Bertani) medium

tryptone	10	กรัม
yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
1 N NaOH	1	มล.
agar	15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000	มล.

นำบดทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

17. LB + Ampicillin medium

เตรียมส่วนผสมของ LB (Luria-Bertain) medium ในข้อ 15
เมื่อกำหนดปราศจากเชื้อแล้ว เติม Ampicillin 50 µg/mL ที่
อุณหภูมิ 45 °C

18. X-gal 20 mg/mL

X-gal	0.02	กรัม
dimethylformamide	1	มล.
เวลาใช้ให้ spread plate สารละลาย X-gal	0.1	มล.(0.1 mg/mL)

บน LB + Ampicillin medium แล้วทิ้งให้แห้ง

19. Tryptone-glucose agar

Beef extract	3	กรัม
Tryptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
เค็มน้ำกลั่น	1000	มล.

เมื่อส่วนผสมละลายแล้วให้นำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

20. Tryptone-glucose broth

Beef extract	3	กรัม
Tryptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
เค็มน้ำกลั่น	1000	มล.

เมื่อส่วนผสมละลายแล้วให้นำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

ภาคผนวก ค

1. การวิเคราะห์ DNA โดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

ใช้ในการแยก DNA หรือวิเคราะห์ DNA ภายใต้สนามไฟฟ้า (electric field) โดยผ่านตัวกลางคือเจล (gel) โดยอาศัยหลักพื้นฐานที่ว่า DNA มีประจุลบเนื่องจากหมู่ฟอสเฟต เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะถูกผลักดันให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่อั้วบวก ความสามารถของ DNA ในการเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางจะขึ้นกับ ขนาดของ DNA รูปร่างของ DNA และความเข้มข้นของ gel

วิธีการ

ซึ่ง agarose ละใน tris-acetate buffer (TAE) หรือ tris-borate buffer (TBE) ให้มีความเข้มข้น (น้ำหนัก / ปริมาตร) ตามต้องการ นำไปต้มให้ agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ buffer จากนั้นเทใส่ gel chamber ที่วาง comb เรียบร้อย หึงไว้จนแข็งตัว เท buffer จนท่วม gel ถึง comb ออกจะได้ช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง เตรียมตัวอย่าง DNA ผสม loading dye แล้วหยดลงในช่องของ gel เปิดกระแสไฟฟ้าให้มันแรงเคลื่อน 2-10 Volt/cm (แล้วแต่ความเหมาะสมของขนาด DNA ที่จะแยก เมื่อครบเวลา นำ agarose gel ไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 µg/mL นำ gel ไปดูบนแผ่นของ DNA โดยใช้ U.V.transilluminator

2. การหาค่า total radioactivity และ incorporated radioactivity

ด้วยวิธี trichloroacetic acid precipitation

Total radioactivity (55)

นำ radioactive DNA ที่ได้จากการติดฉลากสารรังสี จำนวน 2 µL มาจุดลงบนกระดาษ Whatman GF/A โดยไม่ต้องทำ trichloroacetic acid precipitation นำไปวัดด้วย liquid scintillation counter

Incorporated radioactivity (55)

นำ radioactive DNA ที่ได้จากการติดฉลากสารรังสี จำนวน 2 µL มาตกตะกอน DNA ด้วยวิธี trichloroacetic acid precipitation โดยนำ DNA มาใส่ในส่วนผสมของ 100 µL cocktail salmon sperm DNA (500 µg/mL salmon sperm DNA, 20 mM EDTA) หลังจากนั้นให้เติม ice cold 10% TCA (10% trichloroacetic acid) 5 mL ค้างทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษ Whatman GF/A จากนั้นล้าง DNA บนกระดาษกรองด้วย ice cold 10% TCA 6 ครั้ง ครั้งละ 5 มล. และ 95% ethanol 5 มล. อีกหนึ่งครั้ง นำกระดาษ Whatman GF/A ที่ได้ไปวัดค่า incorporated radioactivity ด้วย liquid scintillation counter

ประวัติผู้เขียน

นางสาววิสาครี คงเจริญสุนทร เกิดวันที่ 24 พฤษภาคม พ.ศ.2510 อาเภอเมือง
จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2532 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.2533

