เอกสารอ้างอิง

1. Esteban,R., Villanueva,J.R.,and Villa,T.G. 1982. β-D-Xylanase of *Bacillus circulans* WL-12. Can. J. Microbiol. 28: 733-739.

2. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnol. 3(11): 286-290.

3. Dekker , R.F.H. , and Richards , G.N. 1976. Hemicelluloses : their occurence, and mode of action. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32: 317-352.

4. Nakajima, T., Tsukamota, K., Watanabe, T., Kainuma, K., and Matsuda, K. 1984. Purification and some properties of an endo-1,4-β-D-xylanase from *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 62(3): 269-276.

5. Yang, R.C.A., MacKenzie, R., Bilous, D., Seligy, V.L., and Narang,S.A. 1988. Molecular cloning and expression of xylanase gene from *Bacillus polymyxa* in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 54(4): 1023-1029.

6. Bucke,C.1977. Industrial glucose isomerase.In A.Wiseman(ed.), Topics in enzyme and fermentation biotechnology. vol.1, pp.147-171. Chichester(UK):Ellis Horwood Ltd.

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

8. Ronceo,M.I.G. 1983. Gene controlling xylan utilization by *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 156(1): 257-263.

9. Kudo, T., Ohkoshi, A., and Horikoshi, K. 1985. Molecular cloning and expression of a xylanase gene of alkalophilic *Aeromonas* sp. No.212 in *E. coli*. J. Gen. Microbiol. 131: 2825-2830.

10. Lee,S.F., Forberg,C.W., and Gibbins,L.N. 1985. Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutyticum*. Appl.Environ. Microbiol. 50(4): 1068-1076.

11. Bhalerao, J., Patki, A.H., Bhave, M., Khurana, I., and Deobagakar,D.N.1990. Molecular cloning and expression of a xylanase gene from *Cellulomonas* sp. into *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 71-76.

12. กาญจนา วรวิทย์วัฒนะ. 2530. การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากสเตรพโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

13. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. 2533. การโคลนและการแสดงออกของไซแลนเนสยีนจาก *Streptomyces* sp. 42-9 ใน *Streptomyces* sp. 190-1. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

14. นฤมล ศุภจรรยา. 2526. การศึกษา กลูโคสไอโซเมอเรส ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 190-1. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

15. Changas , G.S. , Hu , Y. , and Wilson , D.B. 1989. Cloning of a *Thermomonospora fusca* xylanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 171(6): 2963-2969.

16. Mondou, F. , Shareck , F. , Morosoli , R. , and Kluepfel , D. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. Gene. 49: 32-329.

17. Yang,R.C.A., MacKenzie,R., Bilous,D., and Narang,S.A. 1989. Hyperexpression of a *Bacillus circulans* xylanase gene in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. Appl.Environ.Microbiol. 55: 1192-1195.

18. Iwasaki,A., Kishida,H., and Okanishi,M. 1986. Molecular cloning of a xylanase gene from *Streptomyces* sp. No.36a and its expression in *Streptomycetes*. J. of Antibiotics. 39: 985-993.

19. Stryer,L.1988. Biochemistry.3rd ed. New York: W.H.Freeman and Company.

20. Hippel, P.H., Bear, D.G., Winter, R.B., and Berg, O.G. 1982. Molecular aspects of promoter function : An overview. In R.L. Rodriguez and M.J. Chamberlin (ed.),Promoter: Structure and function. pp. 3-33. Praeger Publishers.

21. Pouwells, P. H., 1990. Survey of cloning vectors for *Escherichia coli*. In T.A. Brown (ed.), Essential molecular biology : A Practical approach "vol.1". pp.179-240. New York: IRL Press.

22. Voet, D., and Voet,J.G. 1990. Biochemistry. New York : John Wiley and Sons Inc.

23. Atkinson, T., Barstow, D.A., Jones, S.A., Minton, N.P., and Sherwood, R.F. 1984. Cloning enzyme genes for over-production. Biochem.Soc.Trans. 12(2): 215-218.

24. Bibb, M.J., Janssen, G.R., and Ward, J.M. 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (ermE) of *Streptomyces erythraeus*. Gene. 38: 215-226.

25. Horinouchi,S., Nishiyama,M., Nakamura,A., and Beppu,T. 1987. Construction and characterization of multicopy expression-vectors in *Streptomyces* spp. Mol.Gen.Genet. 210: 468-475.

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

27. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis,T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

28. บุญยืน สาริกะภูติ. 2531. ชีวเคมี เรื่อง กรดนิวคลีอิค. กรุงเทพมหานคร. บัณฑิตการพิมพ์.

29. Vigal, T., Gil, J.A., Daza,A., Gonzalez, M.D.G., Villadas,P., and Martin, F. 1991. Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of α-amylase by *Streptomyces lividans*. Mol.Gen.Genet. 231: 88-96.

30. Goeddel, D.V.,Heyneker,H.L.,Hozumi,T.,Arentzen,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.

31. Oka, M., Yang, Y.S., Nagata, S., Esaki, N., Tanaka, H., and Soda, K. 1989. Overproduction of thermostable leucine dehydrogenase of *Bacillus stearothermophilus* and its one-step purification from recombinant cells of *Escherichia coli*. Biotechnol. Appl. Biochem. 11(3): 307-311.

32. Tabor, S., and Richardson, C.C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/ promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 82: 1074-1078.

33. Pinphanichakarn, P. 1989. Cloning of chromosomal genes into plasmid vectors. An ICGEB Workshop organized by John Innes Institute , U.K. on Genetic Manipulation of *Streptomyces* held at Huazhong Agricultural University Wuhan, China during 9-24 April 1989. (Mimeographed)

34. Clayton,T.M., and Bibb,M.J. 1990. *Streptomyces* promoter-probe plasmids that utilised the *xylE* gene of *Pseudomonas putida*. John Innes Institute and AFRC Institute of Plant Science Research, Norwich, U.K. (Mimeographed)

35. Morosoli,R.,Bertrand,J.,Mondou,F.,Shareck,F., and Kluepfel,D. 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. J. Gen. Microbiol. 131: 1299-1303.

36. Brown,T.A. 1990. Generation and identification of recombinant clones. In T.A. Brown (ed.), Essential molecular biology: A Practical approch "vol. 1". pp.161-177. New York: IRL Press.

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

38. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2534. เทคโนโลยีการเตรียมพลาสมิด. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพ. 7: 8-9.

39. Hopwood, D.A., Bibb,M.J., Chater,K.F., Kieser,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: The John Innes Foundation.

40. Kieser,T. 1984. Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Plasmid. 12:19-36.

41. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J.Biol.Chem. 195: 19-23.

42. Nelson,N. 1954.A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem. 153: 375-380.

43. Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature. 227: 680-685.

44. วิชัย บุญแสง. 2528. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE).เอกสารประกอบการประชุมปฏิบัติการเรื่อง เทคนิคการขยายยีนและตัดต่อยีน. จัดโดย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และศูนย์อณูพันธุศาสตร์ - พันธุวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 189-194.

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

46. กมลวรรณ มั่นภักดี. 2534. การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp.42-9. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

47. Hanahan,D.1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J.Mol.Biol. 166: 557-580.

48. Matsushima, T., and Baltz, R.H. 1985. Efficient plasmid transformation of *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae* protoplasts.J.Bacteriol. 163(1): 180-185.

49. Hopwood, D.A., Kieser, T., Lydiate, D.J., and Bibb,M.J. 1986. Streptomyce Plasmids : Their biology and use as cloning vectors. In S.W. Queener and L.E. Day (eds.), The bacteria : A treatise on structure and function : vol.IX Antibiotic-producing *Streptomyces*. pp.156-229. New York: Academic Press Inc.

50. Richardson, M.A., Mabe, J.A., Beerman,N.F., Nakatsukasa,W.M., and Fayerman, J.T. 1982. Development of cloning vehicles from the *Streptomyces* plasmid pIJ103. Gene. 20: 451-457.

51. Hopwood,D.A. 1986. Gene cloning in *Streptomyces* spp. in A.L. Demain and N.A. Solomon (eds.) , Manual of industrial microbiology and biotechnology.pp.198-203. Washington D.C.: American Society for microbiology.

52. Bibb,M.J., Schottel,J.L., and Cohen,S.N. 1980. A DNA cloning system for interspecies gene transfer in antibiotic-producing *Streptomyces*. Nature. 284: 526-630.

53. ศิริพร สิทธิประณีต. 2531. พันธุวิศวกรรม: ปฏิบัติการเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร: ส.วิชาญการพิมพ์.

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

55. Hunter,I.S. 1985. Gene cloning in *Streptomyces*. In D.M.Glover (ed.) DNA Cloning "vol 2". pp.19-44. London: U.K.

56. Robbins,W.R., Wirth,D.F., and Hering,C. 1981. Expression of the *Streptomyces* enzyme endoglycosidase H in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 256: 10640-10644.

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

58. Bibb, M.J., Bibb, M.J., Ward, J.M., and Cohen, S.N. 1985. Nucleotide sequences encoding and promoting expression of three antibiotic resistance genes indigenous to *Streptomyces*. Mol.Gen.Genet. 199:26-36.

59. Pelczar,M.J., Chan,E.C.S., and Krieg,N.R. 1986. Microbiology. pp.227-258. Singapore: McGraw-Hill Book Inc.

60. Farnsworth, M.W. 1988. Genetics. 2nd. ed. p.502. New York: Harpers and Row Publisher.

61. สกล พันธุ์อ้ม. 2530. DNA Probe เพื่อการตรวจสารพันธุกรรม.เอกสารประกอบการฝึกอบรมพันธุวิศวกรรม เรื่อง DNA Probe ในการ วินิจฉัยเชื้อโรคและพาหะ. จัดโดยห้องปฏิบัติการด้านจุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ร่วมกับภาควิชาชีวเคมีและศูนย์อณูพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 2-1 ถึง 2-10.

62. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria Bertani (LB)

สำหรับ *E. coli* (26)

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
ยีสต์เอกซ์แทรค (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (LA) เติมวุ้น (agar) อีก 1.5 กรัม

กรณีที่ต้องเลี้ยง *E. coli* ที่มีพลาสมิด pUC19 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LA ต้องใส่ x-gal และ IPTG ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LA ขณะที่มีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ x-gal เป็น 40 ไมโครกรัม/มล. และ IPTG เป็น 35 ไมโครกรัม/มล. โดยเตรียมสารละลาย x-gal ตั้งต้นเข้มข้น 20 มก/มล. ในสารละลาย dimethylformamide ส่วน IPTG ละลายในน้ำ แล้วกรองผ่านเยื่อกรอง (millipore membrane) ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลาย IPTG เป็น 200 มก./มล.

สำหรับ Streptomyces (39)

กลูโคส (glucose)	1	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
ยีสต์เอกซ์แทรค (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส โดยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (13)

ไซแลน (xylan)	10	กรัม
โปรตีโอสเปปโตน (proteose peptone)	1	กรัม
ยีสต์แอกซ์แทรค (yeast extract)	2	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.4	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)*	0.3	กรัม
trace metal solution**	1	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0

* แยกนึ่งฆ่าเชื้อ

** trace metal solution 100 มล.

โคบอล์ตคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	200	มก.
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	500	มก.
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$)	160	มก.
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	140	มก.

ปรับ pH ให้เท่ากับ 3.0

ก.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร MS (13)

มานิทอล (manitol)	20	กรัม
ถั่วเขียวบดละเอียด	20	กรัม
วุ้น (agar)	18	กรัม

เติมน้ำประปาและน้ำกลั่น 2 ส่วน เท่า ๆ กันจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.4 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YEME (39)

ซูโครส (sucrose)	340	กรัม
กลูโคส (glucose)	10	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
ยีสต์เอกซ์แทรค (yeast extract)	3	กรัม
มอล์ตเอกซ์แทรค (malt extract)	3	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.7H_2O$)	1.15	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

ก.5 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ R2YE (39)

ส่วนที่ 1 R2A

กลูโคส (glucose)	20	กรัม
กรดคาซามิโน (casamino acids)	0.2	กรัม
โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.7H_2O$)	20.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	5.9	กรัม
วุ้น (agar)	44	กรัม
trace element solution*	4	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

* trace element solution

ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	40	มก.
เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)	200	มก.
คิวปริกคลอไรด์ ($CuCl_2.2H_2O$)	10	มก.
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	10	มก.
โซเดียมเตตราบอเรท ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)	10	มก.
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)	10	มก.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนที่ 2 R2B

ซูโครส (sucrose)	203	กรัม
ยีสต์แอกซ์แทรค (yeast extract)	10	กรัม
TES (N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid)	11.5	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

หลังจากนึ่งอบฆ่าเชื้อแล้ว ผสมส่วนที่ 1 และ 2 ปริมาตรเท่า ๆ กัน แล้วเติม 0.5% โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 มล./สารละลาย 200 มล.

ก.6 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนส (13)

ไซแลน (xylan)	10	กรัม
ยีสต์เอกซ์แทรค (yeast extract)	10	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)*	4	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)*	0.02	กรัม
วุ้น (agar)	20	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0

* แยกนึ่งฆ่าเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์ และ สารเคมี

ข.1 สารละลายสำหรับไลโซไซม์ (lysozyme solution)

สำหรับเชื้อ *E. coli* (38)

ซูโครส (sucrose)	0.44	โมลาร์
ทริสมาเบส (trisma base)(pH 8.0)	25	มิลลิโมลาร์
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH 8.0)	10	มิลลิโมลาร์

สำหรับเชื้อ *Streptomyces* (40)

ซูโครส (sucrose)	0.3	โมลาร์
ทริสมาเบส (trisma base)(pH 8.0)	25	มิลลิโมลาร์
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH 8.0)	25	มิลลิโมลาร์

ข.2 3 โมลาร์ โปตัสเซียมอะซีเตท (potassium acetate) (38)

โปตัสเซียมอะซีเตท	294.2	กรัม
น้ำกลั่น	600	มล.
กรดอะซีติคเข้มข้น (gracial acetic acid)	120	มล.

ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

ข.3 บัฟเฟอร์ TE (40)

ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ (trisma-HCl)	10	มิลลิโมลาร์
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH 8.0)	1	มิลลิโมลาร์

ข.4 ฟีนอลคลอโรฟอร์ม (40)

ฟีนอล (phenol)	5	กรัม
คลอโรฟอร์ม (chloroform)	5	มล.
น้ำกลั่น	1	มล.
ไฮดรอกซีควิโนลิน (8-hydroxyquinoline)	5	มก.

ข.5 บัฟเฟอร์ P (39)

ซูโครส (sucrose)	103	กรัม
โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	0.25	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$)	2.02	กรัม
trace element solution (ภาคผนวก ก.7)	2	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มล. หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม

0.5% โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	มล.
3.68% แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	10	มล.
5.73% TES (N-tris(hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid)	10	มล.

ข.6 บัฟเฟอร์ TA (tris-acetate buffer)

เตรียมเข้มข้น 5 เท่า

ทริสมาเบส (trisma base)	24.2	กรัม
กรดอะซีติคเข้มข้น (gracial acetic)	5.71	มล.
0.5 โมลาร์ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH 8.0)	10	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข.7 บัฟเฟอร์ TB (tris-borate buffer)

เตรียมเข้มข้น 5 เท่า

ทริสมาเบส (trisma base)	54	กรัม
กรดบอริค (boric acid)	27.5	กรัม
0.5 โมลาร์ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (pH 8.0)	20	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า

ข.8 สีติดตาม (tracking dye)

เตรียมเข้มข้น 5 เท่า

ซูโครส (sucrose)	60	%
โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue)	0.25	%
ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ (trisma hydrochloride) pH 8.0	100	มิลลิโมลาร์
Na_2EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetic acid)	0.5	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	100	มิลลิโมลาร์

ข.9 ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล GENECLEAN II kit ประกอบด้วย

- สารละลายโซเดียมไอโอไดด์ (NaI)
- สารละลาย NEW
- GLASSMILK

ข.10 25% polyethylene glycol (PEG)

ชั่ง PEG (น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1000) 1 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนใช้เติมบัฟเฟอร์ P ปริมาตร 3 มล. จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข.11 อัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนท์ (alkaline copper reagent)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 71 กรัม และโรเชล ซอล์ท (Rochelle salt) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มล. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มล. แล้วเติมสารละลายของคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ความเข้มข้น 10% 80 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วทำให้ร้อน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) จำนวน 180 กรัม ละลายให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองออกแล้วจึงนำไปใช้

ข.12 เนลสัน รีเอเจนท์ (Nelson reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$] 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มล. แล้วเติมกรดซัลฟุริคเข้มข้นปริมาตร 21 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายของโซเดียมอาซิเนท ($NaHAsO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 12% 50 มล. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองออกแล้วจึงนำไปใช้

ข.13 สารละลายอะคริลาไมด์ (acrylamide stock) (43)

อะคริลาไมด์ (acrylamide)	30	กรัม
BIS (N,N-methylene bis acrylamide)	0.8	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล.

เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 2 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข.14 สารละลายผสมของ separating gel (43)

สารละลายอะคริลาไมด์ จาก ข.13	6.65 มล.
1.5 โมลาร์ ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ (tris-HCl) pH 8.8	5 มล.
น้ำกลั่น	8.05 มล.
10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate:SDS)	0.2 มล.
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine)	15 ไมโครลิตร
สารละลาย 10%แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$)	0.15 มล.

ข.15 สารละลายผสมของ stacking gel (43)

สารละลายอะคริลาไมด์ จาก ข.13	2.4 มล.
0.5 โมลาร์ ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ (tris-HCl) pH 6.8	5 มล.
น้ำกลั่น	12.3 มล.
10% SDS	0.2 มล.
TEMED	20 ไมโครลิตร
สารละลาย 10%แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$)	0.1 มล.

ข.16 บัฟเฟอร์สำหรับทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (running buffer) (43)

ทริสมาเบส (trisma base)	1.5 กรัม
ไกลซีน (glycine)	14.4 กรัม
10% SDS	10 มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข.17 สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนตามวิธีของ Lowry (45)

Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรท ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)	0.6	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 3 ลิตร

Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

Lowry D (phenol reagent)

สารละลาย Folin phenol reagent	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

ข.18 บัฟเฟอร์ที่มีสีติดตาม (sample buffer) (43)

0.5 โมลาร์ ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ (tris-HCl) pH 6.8	12.5	มล.
กลีเซอรอล (glycerol)	10	มล.
10% SDS	30	มล.
โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue)	0.005	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข.19 สารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน (staining solution) (43)

โคแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์-250

(coomassie brilliant blue R-250)	5	กรัม
กรดอะซิติคเข้มข้น (glacial acetic acid)	100	มล.
เอธานอล (ethanol)	450	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

ข.20 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution) (43)

กรดอะซิติคเข้มข้น (glacial acetic acid)	100	มล.
เอธานอล (ethanol)	250	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มล.

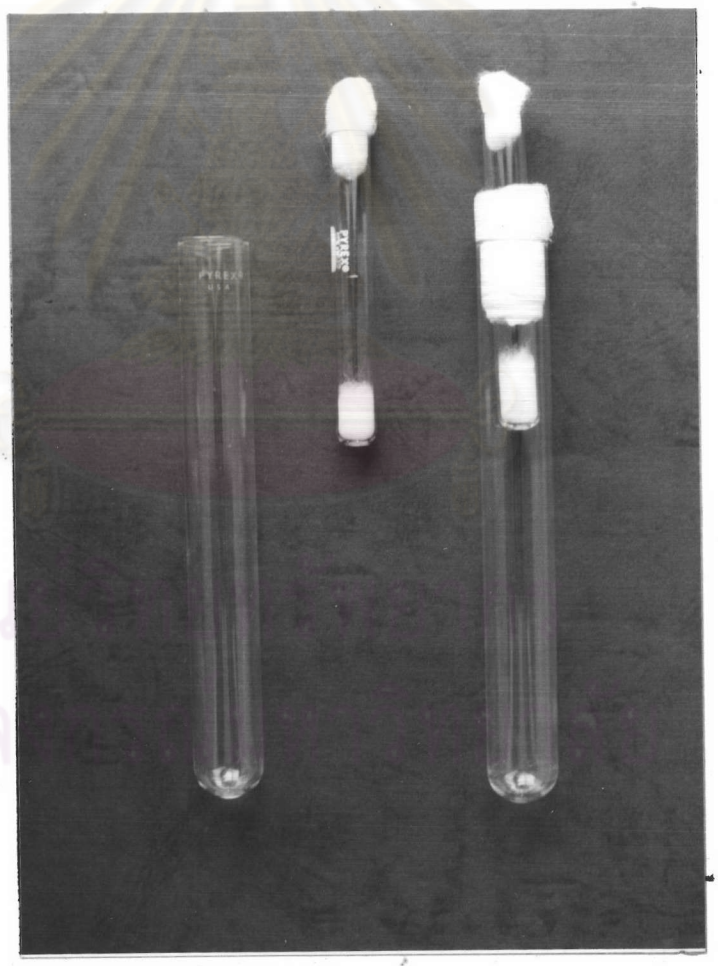
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

อุปกรณ์อื่น ๆ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.1 ชุดกรองสปอร์และโปรโตพลาสท์ของ Streptomyces



ค.2 ลักษณะการวางขดลวดสปริงที่ก้นขวดสำหรับการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวปาหนัน เริงสำราญ เกิดเมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2509 ที่จังหวัดสกลนคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ในปีการศึกษา 2530

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย