เอกสารอ้างอิง

1. Chen, W.P., "Glucose Isomerase. (a Review)," Process Biochem. 15, 30-35, 1980.

2. นฤมล ศุภจรรยา,"การศึกษากลูโคสไอโซเมอเรสที่ผลิตโดยสเตรพโตมัยซิส สายพันธุ์ 190-1",วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526.

3. คิริลักษณ์ ธีระดากร," การผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces sp.* 190-1ในถังหมัก,"วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2529.

4. Bucke,C.,"Industrial Glucose Isomerase,"Enzyme and Fermentation Biotechnology (Wiseman, A., ed.) pp. 147-171, John Wiley & Sons Inc., New York, 1977.

5. Takasaki,Y.,"Studies on Sugar-Isomerizing Enzyme : Production and Utilization of Glucose Isomerase from *Streptomyces sp.*," Agric.Biol. chem., 30, 1247-1253, 1966.

6. Takasaki,Y.,"Formation of GI by *Streptomyces sp.*,"Agric. Biol. Chem.,38, 667-668, 1974.

7. Tsumura,N.,and T. Sato," Enzymatic Conversion of D - Glucose to D - Fructose. Part VI Properties of enzyme from *Streptomyces phaeochromogenes*, " Agric. Biol. Chem., 29, 1129-1134, 1965.

8. Chen, W.P., A.W. Anderson,and Y.W. Han,"Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces flavogriseus*, " Appl.Envi. Microbiol.,37, 324-331, 1979

9. Nand, K.,S.Srikanta, R.Joseph,M.S. Shanthamma, and V.S.Murthy, "Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces fradiae*,"J. Exp. Biol.,15, 668-669, 1977.

10. Baltz, R. H.," Strain Improvement ," Mannual of Industrial Microbiology and Biotechnology (Demain,A.L., and N.A. Solomon, eds.),pp.154,ASM, WC, U.S.A., 1986.

11. Hopwood, D.A., H.M. Wright, M.J. Bibb, and S. N. Cohen, "Genetic Recombination through Protoplast Fusion in *Streptomyces*," Nature, 268, 171-174, 1977.

12. Kao, K.N., and M.R.Michayluk," A Method for High - Frequency Intergenic Fusion of Plant Protoplasts" Planta , 115 , 355-367, 1974.

13. Hopwood,D.A.,"Genetic Studies with Bacterial Protoplasts," Ann. Rev. Microbiol.,35, 237-272, 1981.

14. Baltz, R.H.," Genetic Recombination in *Streptomyces fradiae* by Protoplast Fusion and Cell Regeneration.,"J.Gen. Microbiol., 107, 93-102, 1978.

15. Foder, K.,and L. Alfoldi,"Polyethylene-Glycol Induced Fusion of Bacterial Protoplasts," Molec. Gen. Genet., 168 : 55-59, 1979.

16. Godfrey,O.,L. Ford, and M.L.B. Huber," Interspecies Matings of *Streptomyces fradiae* with *Streptomyces bikiniensis* Mediated by Conventional and Protoplast Fusion Techniques," Can. J.Microbiol.,24, 994-997, 1978.

17. Ochi, K., J.M. Hitchcock, and E. Katz," High Frequency Fusion of *Streptomyces antibioticus* Protoplasts Induced by Polyethylene Glycol.,"J.Bacteriol.,139, 984-992,1979.

18. Sagara, Y., K. Kukui, F. Ota, N. Yoshida, T. Kashiyama , and M. Fujimoto ," Rapid Formation of Protoplasts of *Streptomyces griseoflavus* and Their Fine Structure, " Jpn. J. Microbiol.,15,73-84, 1971.

19. Hammes, W., K.H. Schleifer, and O. Kandler," Mode of Action of Glycine on the Biosynthesis of Peptidoglycan, "J.of Bacteriol.,116(2), 1029-1053, 1973.

20. Okanishi,M., K. Suzuki,and H.Umezawa,"Formation and Reversion of Streptomyces Protoplasts : Cultural Condition and Morphological Study.," J. Gen. Microbiol., 80, 389-400, 1974.

21. Hopwood, D.A.," Genetic Studies with Bacterial Protoplasts," Ann. Rev. Microbiol., 35, 237-272, 1981.

22. Hunter, I. S.," Gene Cloning in *Streptomyces*, " DNA Cloning (Glover,D.M. ed.), Vol 2, pp.19-44, IRL Press Limited, London, 1985.

23. Keller, U., S Poschmann, U. Krengel, H. Kleinkauf, and G. Kraepelin ," Studies of Protoplast Fusion in *Streptomyces chrysomallus*," J. Gen. Microbiol., 129, 1725-1731, 1983.

24. Thompson, C.J., J.M. Ward, and D.A. Hopwood ," DNA Cloning in *Streptomyces* : Resistance Genes from Antibiotic - Producing Species," Nature, 286, 525-527, 1980.

25. Illing, G.T., I.D. Normansell, and J.F. Peberdy ," Protoplast Isolation and Regeneration in *Streptomyces clavuligerus*," J.Gen.Microbiol.,135,2289-2297,1989.

26. Pigac, J., D. Hranueli, T. Smokvina, and M. Alacevic,"Optimal Cultural and Physiological Conditions For Handling *Streptomyces rimosus* Protoplasts ," Appl. and Envi. Microbiol., 44(5),1178-1186, 1982.

27. Merdamadi - Tehrani, J., J.I. Mitchell, S.T. Williams, and D.A. Ritchie," Factors Affecting Protoplast Formation and Regeneration by Four Species of *Streptomyces*,"

Lett. Appl.Microbiol., 3, 27-30, 1986.

28. Shirayama, T., T. Furamai, and M. Okanishi," A Modified Regeneration Method for Streptomyces Protoplasts," Agric. Biol.Chem., 45, 1271-1273, 1981.

29. Hooley, P., and A.H.M. Wellington,"Formation and Regeneration of Protoplasts of *Streptomyces hygroscopicus*," Lett.Appl.Microbiol.,1, 77-80, 1985.

30. Baltz,R.H.,and P.Matsushima,"Protoplast Fusion in Streptomyces Condition for Efficient Genetic Recombination and Cell Regeneration," J. Gen. Microbiol., 127, 137-146, 1981.

31. Kohler, J., and G. Darland,"Protoplast Fusion in *Streptomyces avermitilis*," J. of Ind. Microbiol., 3, 331-220,1980.

32. Hopwood,D.A., M.J.Bibb, C.J.Bruton, H.M. Kieser, D.J.Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf," Genetic Manipulation in Streptomyces : a Labolatory Mannual, John Innes Foundation, Norwich, U.K., 1985.

33. Hopwood, D.A., and H.M. Wright,"Factors Affecting Recombinant Frequency in Protoplast Fusion of *Streptomyces coelicolor*,"J. Gen. Microbiol., 111, 137-143, 1979.

34. Ochi,K., and E.Katz,"The Possible Involvement of a Plasmid(s) in Actinomycin Synthesis by *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces antibioticus* ," J. Antibiot., 31, 1143-1148, 1978.

35. Valin, C., R. Rodriquez, A. Ramos, E. Alonso, and Biro," Increased Oxytetracycline Production in *Streptomyces rimosus* after Protoplast Fusion," Biotech. Lett., 8(5), 343-344, 1986.

36. Hranueli, D., J. Pigac, T. Smokvina, and M. Alacevic,"Genetic Interactions in *Streptomyces rimosus* Mediated by

Conjugation and by Protoplast Fusion,"J.Gen.Microbiol., 129, 1415-1422, 1983.

37. Petty,T.M.,and D.L.Crawford,"Enhancement of Lignin Degradation in *Streptomyces spp.* by Protoplast Fusion," Appl. and Envi.Microbiol., 47(2), 439-440, 1983.

38. Ogata, S., S. Yamada, and S. Hayashida,"Genetic Recombination in *Streptomyces azureus* by Protoplast Fusion and High Production of Thiostrepton by the Recombinants," J. Gen. Appl. Microbiol.,31, 187-191, 1985.

39. Yamashita, F., K.Hotta, S.Kurasawa, Y.Okami, and H. Umezawa, "New Antibiotic - Producing Streptomycetes, Selected by Antibiotic Resistance as a Marker," J. Antibiot., 38(1), 58-63, 1985.

40. Hodgkin, J.A., "High Fructose : A Growing World Role," Sugar y Azucar,82,15-23, 1987.

41. Richard, L.A., C. William, and J.C. Bern ," Glucose Isomerase Production of High - Fructose Syrups," Appl. Biochem. and Bioeng."(Lamuel, B.W., K.K.Ephraim, and G.S.Leon, eds.)Vol.2, pp.97-155, Academic Press, New York, 1979.

42. กาญจนา วรวิทย์วัฒนะ"การผลิต Xylanase จากสเตรพโตมัยซิส สายพันธุ์ 42-9," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2530.

43. Marshall, R.O.,and E.R. Kooi,"Enzyme Conversion of D-Glucose to D - Fructose," Science, 125, 648-649, 1957.

44. Dische, Z., and E. Borenfreund," A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses,"J.Biol.Chem., 192, 583-587, 1951.

45. Nakajima, T., T. Tsukamoto, T. Watanabe, K. Kainuma, and K. Malsuda ," Purification and Some Properties of an

Endo - 1,4-β- D - Xylanase from *Streptomyces sp.*," J. Ferment. Technol., 62(3), 269-276, 1984.

46. Morosoli, R., J. Bertrand, F. Mondon, F. Shareck, and D. Kluepfel," Purification and Properties of a Xylanase from *Streptomyces lividans*,"J. Gen. Microbiol., 239, 587-592,1986.

47. Somogyi, M.," Note on Sugar Determination," J. biol. Chem., 195, 19-23, 1952.

48. Nelson,N.,"A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose," J. Biol. Chem., 153, 375-380, 1954.

49. Hopwood, D.A., and H.M. Wright,"Bacterial Protoplast Fusion : Recombination in Fused Protoplast of *Streptomyces coelicolor*,"Molec. and Gen. Genet.,162,307-317, 1978.

50. Hopwood, D.A., and H.M. Wright," Protoplast Fusion in *Streptomyces*: Fusion Involving Ultraviolet-Irradiated Protoplasts," J. Gen. Microbiol., 126, 21-27, 1981.

51. Bibb, M.J., J.M. Ward, and D. A. Hopwood," Transformation of Plasmid DNA into *Streptomyces* at High Frequency," Nature., 274, 398-400, 1978.

52. Ferenczy,L.,"Microbial Protoplast Fusion," Genetics as a tool in Microbiology (Glover, S.W., and D.A. Hopwood,eds.) pp.1-33, Cambridge University Press, 1981.

53. Nakano,M.M., H.Ishihara, and H.Ogawara,"Fusion of Protoplasts of *Streptomyces lavendulae*," J. of Antibiot., 35 (3), 359-361, 1982.

54. Hopwood,D.A., G.Sermonti,and I.Spada - Sermonti,"Heterozygous Clones in *Streptomyces coelicolor*,"J. Gen. Microbiol., 30,249-260, 1963.

55. Ochi, K.,"Protoplast Fusion Permits High - Frequency Transfer of a *Streptomyces* Determinant which Mediated Actinomycin Synthesis," J. of Bacteriol., 150 (2), 592-597, 1982.

56. Kieser, T.," Factor Affecting the Isolation of ccc DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*," Plasmid, 12, 19-36, 1984.

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อาหารวุ้น MS

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แมนนิทอล (mannitol)	20.0	กรัม
กากถั่วเขียวบดละเอียด	20.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	16.0	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที)

1.2 อาหารเหลวยีสต์เอกซแทรก มอลท์เอกซแทรก (YEME)

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ยีสต์ เอกซแทรก (yeast extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
มอลท์เอกซแทรก (malt extract)	3.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	10.0	กรัม
ซูโครส (sucrose)	340.0	กรัม

หลังจากอบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐานแล้ว เติม

2.5 โมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$)	2.0	มล.

1.3 อาหารวุ้น R_2

แบ่งเตรียมเป็น 2 ส่วน คือ R_2/A และ R_2/B

ส่วนที่ 1 R_2/A ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$)	20.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	5.9	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
เคซีนไฮโดรไลเสท (casein hydrolysate)	0.2	กรัม
สารละลาย trace element*	4.0	มล.
วุ้นผง	44.0	กรัม

ส่วนที่ 2 R_2/B ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

TES (N-tris(Hydroxymethyl) methyl-2-amino ethane sulfonic acid) pH 7.2	11.5	กรัม
ยีสต์เอกซแทรก	10.0	กรัม
ซูโครส	203.0	กรัม

หลังจากอบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐานแล้ว ผสมส่วนที่ 2 ลงในส่วนที่ 1 และเติม

0.5% โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	มล.

* สารละลาย trace element

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

1.4 อาหารวุ้น L

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริปโตน (tryptone)	5	กรัม
ยีสต์ เอกซแทรก (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
กลูโคส (glucose)	1	กรัม
วุ้นผง (agar)	10	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน

1.5 อาหารวุ้น minimal medium (MM)

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอล-แอสพาราจีน (L-asparagine)	0.5	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
วุ้นผง (agar)	10.0	กรัม

หลังจากอบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐานแล้ว เติม

กลูโคส (glucose)	10.0	กรัม

1.6 อาหารวุ้นสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลนเนสเบื้องต้น

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ไซแลน (Xylan)	10.0	กรัม
ยีสต์เอกซแทรก (yeast extract)	2.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	4.0	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.02	กรัม
วุ้นผง (agar)	20.0	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7

1.7 อาหารเหลวสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ไซโลส (xylose)	6.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	10.0	กรัม
ยีสต์เอกซแทรก (yeast extract)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.0	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน

1.8 อาหารเหลวสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลนเนสที่มีกากรำข้าวเป็นองค์ประกอบ

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

กากรำข้าว*	50.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	3.0	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.3	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.02	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7

อบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน

* กากรำข้าวจากบริษัทน้ำมันบริโภคไทย

ความชื้น	12.1	%
น้ำมัน	1.3	%

1.9 อาหารเหลวสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลนเนส ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ไซแลน (xylan)	10.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	1.0	กรัม
ยีสต์ เอกซแทรก (yeast extract)	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.4	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCL_2.2H_2O$)*	0.3	กรัม
ทวีน 80	2.0	มล.
สารละลาย trace element**	1.0	มล.

ปรับ pH ให้เป็น 7

อบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน

* แยกอบฆ่าเชื้อ และเติมภายหลัง

** สารละลาย Trace element ใน 100 มล. ประกอบด้วย

โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	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 ให้เป็น 3

2. สารเคมี

2.1 ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ

ชนิดของยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้นเริ่มต้น
กานามัยซิน	100 มก.ต่อมล.
สเตรพโตมัยซิน	10 มก.ต่อมล.
อีริโทรมัยซิน	200 มก.ต่อมล.
คลอแรมเฟนิคอล	25 มก.ต่อมล. ใน 100% เอทธานอล
เตตร้าซัยคลิน	15 มก.ต่อมล. ใน 50% เอทธานอล เก็บในที่มืด
แอมพิซิลิน	100 มก.ต่อมล.

2.2 บัฟเฟอร์ P

ซูโครส (sucrose)	103.0	กรัม
โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	0.25	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$)	2.02	กรัม
สารละลาย trace element (ภาคผนวกที่ 1.9)	2.0	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มล. แบ่งเป็นขวดละ 80 มล.

หลังจากอบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐานแล้ว ในแต่ละขวดเติมสารเรียงตามลำดับ คือ

10.3% โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	มล.
3.68% แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCL_2.2H_2O$)	10.0	มล.
5.73% บัฟเฟอร์ TES ปรับ pH ให้เป็น 7.2	10.0	มล.

2.3 50% โพลีเอทธิลีนไกลคอล ในบัฟเฟอร์ P

ชั่งโพลีเอทธิลีนไกลคอล 1,500 (PEG) 1.0 กรัม ลงในหลอดที่มีฝาเกลียวปิด นำไปอบฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน จากนั้นจึงเติมบัฟเฟอร์ P ที่ปลอดเชื้อลงไป 1 มล.

2.4 รีเอเจนท์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

2.4.1 อัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนท์ (Alkaline Copper Reagent)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 71 กรัม และโรเชล ซอลท์ (Rochelle salt) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มล. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มล. แล้วเติม 10% ของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 80 มล. ลงไป ผสมให้เข้ากัน ทำให้ร้อน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) จำนวน 180 กรัม ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง กรองตะกอนออก แล้วจึงนำไปใช้

2.4.2 เนลสัน รีเอเจนท์ (Nelson Reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มล. แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 21 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายของ 12% โซเดียมอาซิเนท ($NaHAsO_4.7H_2O$) 50 มล. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม. ถ้ามีตะกอนกรองออก แล้วจึงนำไปใช้

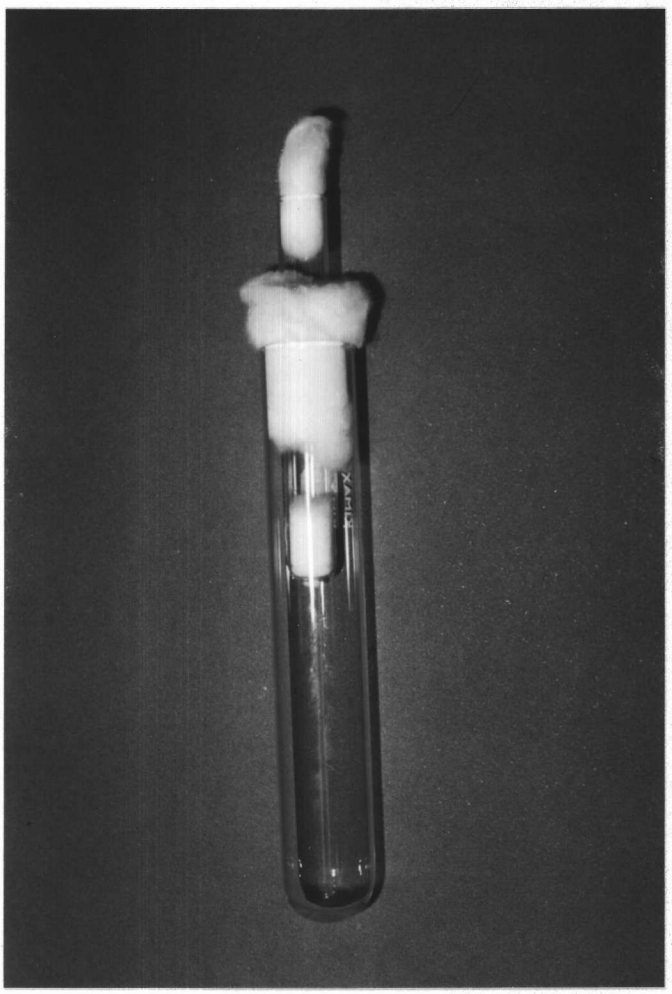
3 ภาชนะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมโปรโตพลาสท์

จากซ้ายไปขวา คือ a) ขวดทรงกรวยธรรมดา

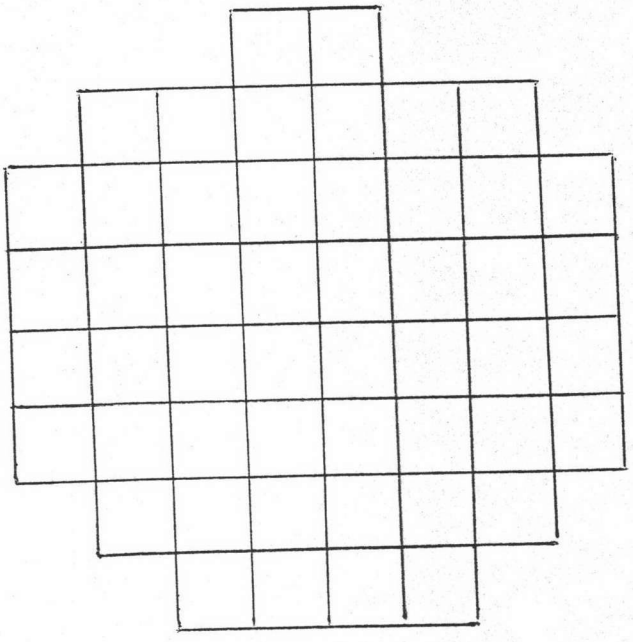
b) ขวดทรงกรวยก้นบุบ

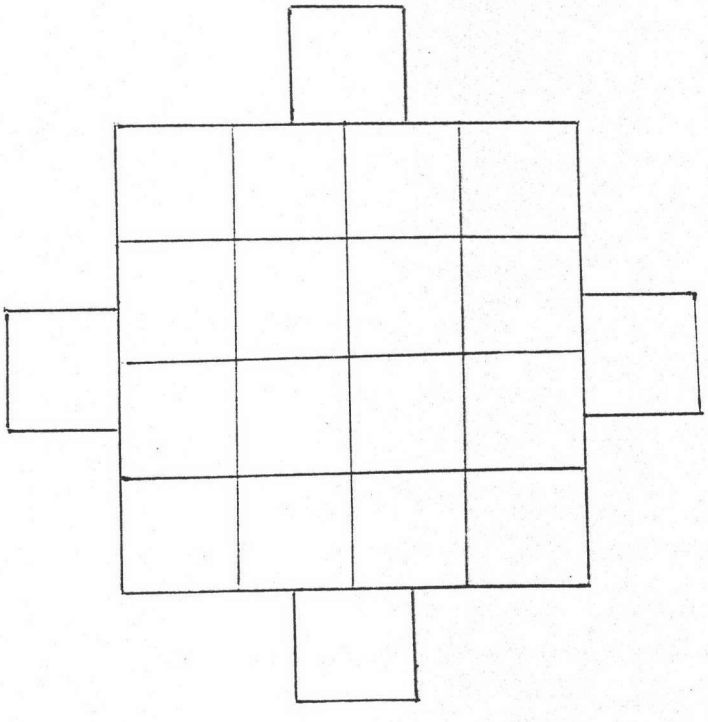
c) ขวดทรงกรวยธรรมดาที่ใส่ขดลวด

4. การเตรียมชุดกรองเพื่อกรองสปอร์และโปรโตพลาสท์



5. ตารางที่ใช้เพื่อทำ master plate ในการวิเคราะห์ลูกผสม





6. การทรานสฟอร์เมชัน

5.1 การสกัดพลาสมิดดีเอนเอจาก *Streptomyces* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด ตามวิธีของ Kieser (55)

1. เลี้ยง *Streptomyces* ที่มีพลาสมิดในอาหารเหลว YEME ที่เติมไธโอสเตรพตรอน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมล. นำมาปั่นแยกไมซีเลียมด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

2. ล้างไมซีเลียมด้วยซูโครส 10.3% 2 ครั้ง แบ่งเซลล์ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ (microfuge tube ขนาด 1.5 มล.) หลอดละ 100 ไมโครลิตร

3. ในแต่ละหลอดเติมไลโซไซม์ 2 มก.ต่อมล. ซึ่งผสมกับ RNase 50 มก. ต่อมล. ในสารละลายสำหรับไลโซไซม์ (0.3 โมลาร์ ซูโครส, 25 มิลลิโมลาร์ ทริสมาเบส pH 8.0, 0.25 มิลลิโมลลาร์ EDTA pH 8)

4. เติม 250 ไมโครลิตรของสารละลาย 2% SDS ซึ่งละลายใน 0.3 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผสมให้เข้ากันโดยทันที นำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70°ซ. เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

5. เติม 100 ไมโครลิตร ฟีนอลคลอโรฟอร์ม ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องปั่นผสมแบบวอร์เทกซ์ (vortex mixer) ประมาณ 10 วินาที จนเห็นสารละลายผสมกันเป็นสีขาวขุ่น

6. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกชั้นของฟีนอลออก ดูดสารละลายใสชั้นบนปริมาตรประมาณ 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ซึ่งบรรจุ 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตอยู่ 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. เติมไอโซโพรพานอล 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

8. นำส่วนของตะกอนมาละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE โดยรวมตะกอนที่ได้จาก 4-6 หลอดเข้าด้วยกันโดยใช้บัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร

9. ตกตะกอนพลาสมิดด้วย 100 มิลลิโมลาร์ สเปอร์มีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (spermine tetrahydrochloride) 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

10. นำส่วนตะกอนมาแขวนลอยใน 0.3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตต 300 ไมโครลิตร ตกตะกอนด้วยเอทธานอล 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. ปั่นแยกตะกอนแล้วล้างด้วยเอทธานอล 70% ก่อนจะนำมาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร

5.2 ทรานสฟอร์เมชั่น

เติมพลาสมิดที่ต้องการทรานสฟอร์มลงในโปรโตพลาสท์แขวนลอย ให้ได้ปริมาณ 1-1.5 ไมโครกรัมต่อโปรโตพลาสท์ 50-100 ไมโครลิตร (10^5-10^7 โปรโตพลาสท์ต่อมล.) แช่ในอ่างน้ำแข็ง ประมาณ 10 วินาที เติม 500 ไมโครลิตร ของ 25% PEG 1500 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 1 นาที เติมบัฟเฟอร์ P ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มล. นำไปเกลี่ยในจานอาหารวุ้น R_2 จานละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้น ราดผิวหน้าของจานอาหารวุ้นให้ทั่วด้วย 1 มล. ของยาปฏิชีวนะไฮโอสเตรพตอนเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมล. เปิดฝาจานทิ้งให้ผิวหน้าแห้งในตู้larminar flow ประมาณ 15 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้

ประวัติผู้เขียน

นางสาว วรางคณา อินทรเสน เกิดวันที่ 30 ธันวาคม พ.ศ. 2507 ในจังหวัดกรุงเทพฯ ได้รับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา จุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2528