เอกสารอ้างอิง

Ajikumar, P.K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T.V. and Stephanopoulos, G. 2008. Terpenoids: Opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. **Molecular Pharmaceutics**, 5(2), 167-190.

Albermann, C., Ghanegankar, S., Lemuth, K., Vallon, T., Reuss, M., Armbruster, W. and Sprenger, G.A. 2008. Biosynthesis of the vitamin E compound δ-tocotrienol in recombinant *Escherichia coli* cells. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, 9(15), 2524-2533.

Albrecht, M., Misawa, N. and Sandman, G. 1999. Metabolic engineering of terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of carotenoid β-carotene and zeaxanthin. **BIOTECHNOLOGY LETTERS**, 21(9), 791-795.

Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology**, 10(5), 411-421.

Carlson, R. and Srienc, F. 2004. Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: Identification of reactions. **Biotechnology and bioengineering,** 85(1), 1-19.

Carter, O.A., Peters, R.J. and Croteau, R. 2003. Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. **Phytochemistry,** 64(2), 425-433.

Das, A., Yoon, S.H., Lee, S.H., Kim, J.Y., Oh, D.K. and Kim, S.W. 2007. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. **Applied microbiology and biotechnology**, 77(3), 505-512.

Engels, B., Dahm, P. and Jenewein, S. 2008. Metabolic engineering of taxadiene synthesis in yeast as a first step towards taxol (paclitaxel) production. **Metabolic Engineering**, 10(3-4), 201-206.

Farmer, W.R. and Liao, J.C. 2001. Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, 17(1), 57-61.

Georgiou, G. and Valax, P. 1996. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology,** 7(2), 190-197.

Gustafsson, C., Govindarajan, S. and Minshull, J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. **TRENDS in Biotechnology,** 22(7), 346-353.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series,** 41, 95-98.

Huang, Q., Roessner, R., Croteau, R. and Scott, A.I. 2001. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene a key intermediate in the biosynthesis of taxol. **Bioorganic & medicinal chemistry,** 9(9), 2237-2242.

Huang, X. and Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome research,** 9(9), 868-877.

Johnston, K., Clements, A., Venkaratamani, R.N., Trievel, R.C. and Marmorstein, R. 2000. Coexpression of proteins in bacteria using T7-based expression plasmid: Expression heteromeric cell-cycle and transcription regulatory complexes. **Protein expression and purification,** 20(3), 435-443.

Kajiwara, S., Fraser, P.D., Kondo, K. and Misawa, N. 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli.* **The Biochemical journal,** 324(Pt 2), 421-426.

Kay, A., O'Kenedy, R., Ward, J. and Keshavarz, M.E. 2003. Impact of plasmid size on cellular oxygen demand in *Escherichia coli.* **Biotechnology and applied biochemistry,** 38(1), 1-7.

Keasling, J.D. 1997. Gene-expression tools for the metabolic engineering of bacteria. **Trends in biotechnology,** 17(11), 452-459.

Keeling, I. and Bohlmann, J. 2006. Genes, enzyme and chemical of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifer against insects and pathogen. **The New phytologist,** 170(4), 657-675.

Kim, S.J., Kim, M.D., Choi, J.H., Kim, S.Y., Ryu, Y.W. and Seo, J.H. 2006. Amplification of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase level increases coenzyme Q_{10} production in recombinant *Escherichia coli.* **Applied microbiology and biotechnology,** 72(5), 982-985.

Kim, S.W. and Keasling, J.D. 2001. Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production. **Biotechnology and bioengineering,** 72(4), 408-414.

Kim, S.W., Kim, J.B., Ryu, J.M., Jung, J.K. and Kim, J.H. 2009. High level production of lycopene in metabolically engineered *E. coli.* **Process Biochemistry,** 44(8), 899-905.

Lee, P.C., Petri, R., Mijts, B.R. and Dannert, C.S. 2004. Investigation of factor influencing production of monocyclic carotenoid torulene in metabolically engineering *Escherichia coli.* **Applied microbiology and biotechnology,** 65(5), 538-546.

Lee, P.C., Petri, R., Mijts, B.R., Watts, K.T. and Dannert, C.S. 2005. Directed evolution of *Escherichia coli* farnesyl diphosphate synthase (IspA) reveals novel structural determinants of chain length specificity. **Metabolic Engineering**, 7(1), 18-26.

Lee, P.C., Yoon, Y.G. and Dannert, C. 2009. Investigation of cellular targeting of carotenoid pathway enzymes in *Pichia pastoris.* **Journal of biotechnology,** 140(3-4), 227-233.

Lindahl, A.L., Olsson, M.E., Mercke, P., Tollbom, O., Schelin, J., Brodelius, M. and Brodelius, P.E. Production of the artemisinin precursor amorphadiene-4,-11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae.* **BIOTECHNOLOGY LETTERS,** 28(8), 571-580.

Martin, J.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D. and Keasling, J.D. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of the terpenoids. **Nature Biotechnology**, 21(7), 796-802.

Martin, J.J., Yoshikuni, Y. and Keasling, J.D. 2001. The in vivo synthesis of plant sesquiterpenes by *Escherichia coli.* **Biotechnology and bioengineering**, 75(5), 497-503.

Masuda, Y., Nakaya, M., Nakajo, S. and Nakaya, K. 1997. Geranylgeraniol potently induces caspase-3-like activity during apoptosis in human leukemia U937 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, 234(3), 641-645.

Matthews, P.D. and Wurtzel, E.T. 2000. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression deoxyxylose phosphate synthase. **Applied microbiology and biotechnology**, 53(4), 396-400.

Miura, Y., Kondo, K., Saito, T., Shimada, H., Frasher, P.D and Misawa, N. 1998. Production of the carotenoids lycopene, β-carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,** 64(4), 1226-1229.

Motorin, Y., Bec, G., Tewari, Y. and Grosjean, H. 1997 Transfer RNA recognition by *Escherichia coli* Δ^2-isopentenyl-pyrophosphate: tRNA Δ^2-isopentenyl transferase: dependence on the anticodon arm structure. **RNA,** 3(7), 721-733.

Muramatsu, M., Ohta, C., Obata, S., Sakuradani, E. and Shimizu, S. 2008. Accumulation of prenyl alcohols by terpenoid biosynthesis inhibitors in various microorganisms. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, 80(4), 589-595.

Murarka, A., Dharmadi, Y., Shams, S. and Gonzalez, R. 2007. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production fuels and chemicals. **Applied and Environmental Microbiology,** 74(4), 1124-1135.

Nishiszaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N. and Yanagawa, H. 2007. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology,** 73(4), 1355-1361.

Nualkaew, N. (2004). **Geranylgeranyl diphosphate phosphatase enzyme and gene of plaunotol biosynthetic pathway in *Croton stellatopilosus* Ohba.** Ph.D. Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Department of Pharmacognosy, Chulalongkorn University.

Nualkaew, N., De-Eknamkul, W., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H. 2005. Geranylgeraniol formation in *Croton stellatopilosus* proceeds via successive monodephosphorylation of geranylgeranyl diphosphate. **Tetrahedron Letters**, 46(50), 8727-8731.

Ohto, C., Muramatsu, M., Obata, S., Sakuradani, E. and Shimizu, S. 2008. Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenyl alcohols. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, 829(5), 837-845.

Ohto, C., Muramatsu, M., Obata, S., Sakuradani, E. and Shimizu, S. 2009. Prenyl alcohol production by expression of exogenous isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase genes in *Escherichia coli.* **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 73(1), 186-188.

Qiang, K., Wei, W., Li-Na, W., Xiao-Dong, D.C. and Ping, Z. 2009. The improvement of amorpha-4, 11-diene production by yeast-conform variant. **Journal of applied microbiology**, 106(3), 941-951.

Redwan, M.E. 2006. The optimal gene sequence for optimal protein expression in *Escherichia coli*: principle requirements. **Arab Journal of Biotechnology,** 9(3), 493-510.

Ricci, J.D. and Hernandez, M.E. 2000. Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. **Critical Reviews in Biotechnology,** 20(2), 79-108.

Ringquist, S., Shinedling, S. and Barrick, D. 1992. Green L, Binkly J, Stormo GD, Gold L. Translation initiation in *Escherichia coli*: sequence within the ribosome-binding site. **Molecular Microbiology**, 6(9), 1219-1229.

Ro, D.K., Paradise, E.M., Ouellet, M., Fisher, K.J., Newman, K.L., Ndungu, J.M., Ho, K.A., Eachus, R.A., Ham, T.S., Kirby, J., Chang, C.Y., Withers, S.D., Shiba, Y., Sarpong, R. and Keasling, J.D. 2006. Production of antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. **Nature Chemical Biology,** 440(13), 940-943.

Rohlin, L., Oh, M.K. and Liao, J.C. 2001. Microbial pathway engineering for industrial processes: evolution, combinatorial biosynthesis and rational design. **Current Opinion in Microbiology**, 4(3), 330-335.

Romier, C., Ben, JM., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P.H., Christodoulou, E., De, M.V., Van, G.S., Knipscheer, P., Lebbink, J.H., Notenboom, V., Poterszman, A., Rochel, N., Cohen, S.X., Unger, T., Sussman, J.L., Moras, D., Sixma, T.K. and Perrakis, A. Coexpression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. 2006. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 62(10), 1232-1242.

Rucker, P., Torti, F.M. and Torti, S.W. 1997. Recombinant ferritin: Modulation of subunit stoichiometry in bacterial expression systems. **Protein Engineering**, 10(8), 967-973.

Ruther, A., Misawa, N., Boger, P. and Sandman, G. 1997. Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. **Applied microbiology and biotechnology,** 48(2), 162-167.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1983. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY: Cold Spring Harbor.

Sitthithaworn, W., Kojima, N., Viroonchatapan, E., Suh, D.Y., Iwanami, N., Hayashi, T., Noji, M., Saito, K., Niwa, Y. and Sankawa, U. 2001. Geranylgeranyl diphosphate synthase from *Scoporia dulcis* and *Croton sublyratus*. Plastid localization and conversion to a farnesyl diphosphate synthase by mutagenesis. **Chemical & pharmaceutical bulletin,** 49(2), 197-202.

Takeda, Y., Nakao, K., Nakata, K., Kawakami, A., Ida, H., Ichikawa, T., Shigeno, M., Kajiya, Y., Hamasake, K., Kato, Y. and Eguchi, K. 2001. Geranylgeraniol an intermediate product in mevalonate pathway induces apoptosis cell death in human hepatoma cells: death receptor-independent activation of caspase-8 with down-regulation of Bcl-xL expression. **Japanese Journal of Cancer Research,** 92(9), 918-925.

Tansakul, P. and De-Eknamkul, W. 1998. Geranylgeraniol-18-hydroxylase: the last enzyme on the plaunotol biosynthetic pathway in *Croton sublyratus*. **Phytochemistry**, 47(7), 1241-1246.

Tokuhiro, K., Miramatsu, M., Ohta, C., Kawaguchi, T., Obata, S., Muramoto, N., Hirai, M., Takahashi, H., Kondo, A., Sakuradani, E. and Shimizu, S. 2009. Overproduction of geranylgeraniol by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(17), 5526-5543.

Tsuruta, H., Paddon, C.J., Eng, D., Lenihan, J.R., Horning, T., Anthony, L.C., Regentin, R., Keasling, J.D., Renninger, N.S. and Newman, J.D. 2009. High- level production of amorphadiene-4, 11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. **Plos One**, 4(2), 1-12.

Vallon, T., Ghanegaonkar, S., Vielhauer, O., Muller, A., Albermann, C., Sprenger, G., Reuss, M. and Lemuth, K. 2008. Quantitative analysis of isoprenoid diphosphate intermediates in recombinant and wild type *Escherichia coli*. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, 81(1), 175-182.

Vetrivel, U., Arunkumar, V. and Doraraj, S. 2007. ACUA: A software tool for automated codon usage analysis. **Bioinformation**, 2(2), 62-63.

Wang, CH., Oh, M.K. and Liao, J.C. 1998. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering**, 62(2), 234-241.

Williams, D.C., McgGarvey, D.J., Katahira, E.J. and Croteau, R. 1998. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active psuedomature form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. **Biochemistry**, 37(35), 12213-12220.

Wungsintaweekul, J. and De-Eknamkul, W. 2005. Biosynthesis of in *Croton stellatopilosus* proceeds via the deoxyxylulose phosphate pathway. **Tetrahedron Letters**, 46, 2125-2128.

Wungsintaweekul, J., Sriyapai, C., Kaewkerd, S., Tewtrakul, S., Kongduang, D. and De-Eknamkul, W. 2007. Establishment of *Croton stellatopilosus* suspension culture for geranylgeraniol production and diterpenoids biosynthesis. **Z. Naturforsch**, 62c, 389-396.

Wungsintaweekul, J., Sirisuntipong, T., Kongduang, D., Losuphanporn, T., Ounaroon, A., Tansakul, P. and De-Eknamkul, W. 2008. Transcription profiles analysis of genes encoding 1-deoxy-D-xylose 5-phosphate synthase and 2*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase in plaunotol biosynthesis from *Croton stellatopilosus*. **Biological & pharmaceutical bulletin,** 31(5), 852-856.

Yoon, S.H., Lee, S.H., Das, A., Ryu, H.K., Jang, H.J., Kim, J.Y., Oh, D.K., Keasling, J.D. and Kim, S.W. 2009. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β-carotene in *E. coli*. **Journal of biotechnology,** 140(3-4), 218-226.

Yoon, S.H., Lee, Y.M., Kim, J.E., Lee, S.H., Lee, J.H., Kim, J.Y., Jung, K.H., Shin, Y.C., Keasling, J.D. and Kim, S.W. 2006. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. **Biotechnology and bioengineering**, 94(6), 1025-1032.

Yuan, L.Z., Rouviere, P.E., Larossa, R.A. and Suh, W. 2006. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. **Metabolic Engineering,** 8(1), 79-90.

Zahiri, H.S., Yoon, S.H., Keasling, J.D., Lee, S.H., Kim, S.W., Yoon, S.C. and Shin, Y.C. 2006. Coenzyme Q_{10} production in recombinant *Escherichia coli* strains engineered with heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway. **Metabolic Engineering,** 8(5), 406-416.

Zhang, D. and Poulter, C.D. 1993. Analysis and purification of phosphorylated isoprenoids by reverse- phase HPLC. **Analytical biochemistry,** 213(2), 356-361.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
รายละเอียดเพิ่มเติมของการศึกษา

การเตรียมน้ำ DEPC (DEPC treated H_2O)

ปิเปตสารละลาย DEPC ปริมาตร 1 mL และปรับปริมาตรให้ได้ 1 L ด้วยน้ำปราศจากอิออน (DI-water) ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ความดัน 121 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมอาหารเหลวสูตร LB (1 L)

อาหารเหลว LB ประกอบด้วย Bacto-Tryptone 10 g, Bacto-yeast extracts 5 g และ NaCl 5 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื่อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 121 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C จนกระทั่งใช้งาน

การเตรียมอาหารแข็งสูตร LB agar (1 L)

อาหารเหลว LB ประกอบด้วย Bacto-Tryptone 10 กรัม, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 5 g และ Bacto-agar จำนวน 15 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 L ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื่อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 121 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

การเตรียม SOC medium (1 L)

อาหารเหลว LB ประกอบด้วย Bacto-Tryptone 20 กรัม, Bacto-yeast extract 5 กรัมและ NaCl 0.5 กรัม จากนั้นเติม 1 M KCl ปริมาตร 2.5 mL และปรับปริมาตรให้ได้ 1 L ด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื่อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 121 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเติม sterile 1 M Glucose ปริมาตร 20 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C จนกระทั่งใช้งาน

การเตรียม Ampicillin stock solution (100 mg/mL)

ชั่ง Ampicillin จำนวน 1 g จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันและกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 μM แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C จนกระทั่งใช้งาน

การเตรียม Carbenicillin stock solution (50 mg/mL)

ชั่ง Carbenicillin จำนวน 0.5 g จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันและกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 μM แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C จนกระทั่งใช้งาน

การเตรียม Chloramphenicol stock solution (34 mg/mL)

ชั่ง Chloramphenicol จำนวน 0.34 g จากนั้นเติม absolute EtOH ปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันและกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 μM แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บที่ อุณหภูมิ -20 ^{0}C จนกระทั่งใช้งาน

การเตรียม 1 M IPTG stock solution

ชั่ง IPTG 1 จำนวน 1.19 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 5 mL ผสมให้เข้ากันและกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 µM แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C จนกระทั่งใช้งาน

การเตรียมสารละลาย 25 mM NH_4HCO_3 pH 8 (1 L)

ชั่ง NH_4HCO_3 จำนวน 1.98 g เติมน้ำกลั่น 900 mL ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย 1M NaOH และปรับปริมาตรให้ครบ 1 L ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 5X TBE buffer (1 L)

ชั่ง boric acid จำนวน 27.5 g, Tris-Base 54 g, 0.5 M EDTA pH 8 จำนวน 20 mL เติมและน้ำกลั่น 800 mL ผสมให้กันจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 L

1X Transfer buffer (1 L)

ชั่ง Tris-base จำนวน 3 g, glycine จำนวน 14.4 g และ MeOH ปริมาตร 200 mL จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 L ด้วยน้ำกลั่น

10X TBST (1 L)

ชั่ง Tris จำนวน 121.1 g, NaCl จำนวน 87.66 g และ Tween -20 ปริมาตร 10 mL เติมน้ำให้ครบ 1 L จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วย 10 M HCl

10X running buffer (1 L)

ชั่ง Tris จำนวน 15 g, Glycine จำนวน 72 g และ SDS จำนวน 5 g จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1 L ด้วยน้ำกลั่น

Coomassie blue stain solution (1 L)

ประกอบด้วย Acetic acid ปริมาตร 100 mL, Methanol ปริมาตร 300 mL, Coomassie Blue R-250 จำนวน 2 g ปรับปริมาตรให้ครบ 1 L ด้วยน้ำกลั่น

Destain solution (1 L)

ประกอบด้วย Acetic acid ปริมาตร 100 mL, Methanol ปริมาตร 300 mL และปรับปริมาตรให้ครบ 1 L ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมเจลสำหรับทำ SDS-PAGE

ส่วนผสม	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
	Separating gel	Stacking gel
MilliQ water	2,000	1,500
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	1,500	-
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	-	625
10% SDS	30	25
Acrylamide/Bis-acrylamide	2400	334
10% Ammonium persulfate	30	15
TEMED	5	5

การเตรียมส่วนผสม 5X loading buffer (10 mL)

ส่วนผสม	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1 M Tris/HCl pH 6.8	600
50% Glycerol	5,000
10% SDS	2,000
2-mercaptoethanol	500
1% Bromophenol blue	1,000
H_2O	900

การเตรียม Competent cell ของ *E. coli* DH5α

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิตรนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายโอนในอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 50 mL เลี้ยงจนกระทั่งมีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่า OD_{600} อยู่ระหว่าง 0.3 ถึง 0.5 จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{0}C นาน 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาทำให้ฟุ้ง (resuspend) ในสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ จำนวน 30 mL นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{0}C นาน 10 นาที (ทำทั้งหมด 2 รอบ) เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มา resuspend ด้วย 15% glycerol ใน 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 2 mL แบ่งใส่หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 100 µl เก็บที่อุณหภูมิ -80 ^{0}C จนกระทั่งใช้งาน

การเตรียม Competent cell ของ *E. coli* BL21(DE3)RIPL

ใช้วิธีการเดียวกับการเตรียม Competent cell ของ *E. coli* DH5α แต่เปลี่ยนอาหารเหลวที่ใช้เป็น LB ที่มีส่วนของ Chloramphenicol 34 μg/mL

ภาคผนวก ข
การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์

การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์

ผลงานที่งานที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติแบบบรรยาย

1. การนำเสนอผลงานวิชาการในหัวข้อเรื่อง การแสดงออกร่วมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของเจอรานิลเจอรานิออลใน *Escherichia coli* ในการประชุมวิชาการ โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต (สกว)สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 3 (TRF-Master research congress III) วันที่ 1-3 เมษายน 2252 จัดขึ้นที่โรงแรมจอมเทียนปาล์มบีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี
2. การนำเสนอผลงานวิชาการในหัวข้อเรื่อง การแสดงออกร่วมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของเจอรานิลเจอรานิออลใน *Escherichia coli* ในการประชุมวิชาการ โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต (สกว)สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 4 (TRF-Master research congress IV) วันที่ 30 มีนาคม -1 เมษายน 2253 จัดขึ้นที่โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี

บทความวิจัยที่ตีพิมพ์ในเอกสารการประชุมทางวิชาการ (Conference Proceedings)

1. **A. Klamrak**, P. Promdonkoy, S. Tanapongpipat, N. Nualkaew, N. Guennewich, W. De-Eknamkul and T.M Kutchan. Production of geranylgeraniol in metabolically engineering *Escherichia coli*. Pure and applied chemistry international conference 2010, Ubon Ratchathani, Thailand, January 21-23 (2010).

การเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการแบบโปสเตอร์

1. Coexpression of genes involved in geranylgeraniol biosynthetic pathway. International conference of life sciences 2008, Queen Sirikit national convention center, Bangkok, Thailand, November 25-27 (2008).
2. Production of geranylgeraniol in metabolically engineering *Escherichia coli*. Pure and applied chemistry international conference 2010, Ubon Ratchathani, Thailand, January 21-23 (2010).
3. Factor affected on the extracellular expression of prenyl diphosphate phosphatase in *Pichia pastoris*. The 2nd annual international conference of northeast pharmacy research 2010, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Thailand, February 13-14 (2010).