เอกสารอ้างอิง

ประภาษ กาวิชา. 2546. การจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จากแหล่งผลิตแตงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเทคนิค ARDRA. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปัทมวรรณ มณีสุวรรณ. 2546. การพัฒนาเทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของแตงโม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ พิศาล ศิริธร. 2545. การวินิจฉัยโรคใบจุดเหลี่ยมของแตงด้วยเทคนิค ELISA. หน้า 361-375 ใน: การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2545, วันที่ 28-29 มกราคม 2545มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้า ปี 2542-2550. ค้นเมื่อ 25 มิถุนายน 2552. จาก http://www.oae.go.th/ewt_news.

ยุทธ ทนโม๊ะ. 2549. โพลีโคลนอลแอนติซีรั่มต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. ว. วิทย์. กษ. 37(6) (พิเศษ): 117-120.

_____. 2550. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในพืชวงศ์แตง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

อนุวัฒน์ ดีรักษา และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2550. การผลิตแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคลำต้นเน่าข้าวโพด. หน้า 131-133 ใน: การสัมมนาทางวิชาการเกษตรประจำปี 2550, 22 มกราคม 2550. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology, fourth edition. Academic Press., New York, USA.

Al-Dujaili, A. H. and Harris, D. M. 1974. Evaluation of commercially available antiseraserotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Clinical Pathology 27: 569-571.

Bachmann, A. S. and Patil, S. S. 2003. Characterization of ornithine decarboxylase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicol*a and its inhibition by phaseolotoxin. Physiological and Molecular Plant Pathology 63: 57-63.

Bozso, Z., Ott, P. G., Szatmari, A., Czelleng, A., Varga, G., Besenyei, E., Sardi, E., Banyai, E., and Klement, Z. 2005. Early detection of bacterium-induced basal resistance in tobacco leaves with diaminobenzidine and dichlorofluorescein diacetate. Phytopathology 153: 596-607.

Carrillo-Castaneda, G., Munoz, J. J., and Peralta-Videa, J. R. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. Microchemical Journal 81: 35-40.

Chang, C. Y., Chao, C. C., and Chao, W. L. 2007. An evaluation of the diversity of fluorescent pseudomonads in maize rhizosphere using 16S-23S rDNA intergenic spacer region restriction fragement length polymorphisms and Biolog GN plate method. Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science 45: 67-75.

Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T. W., and Swings, J. 2001. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. Phytopathology 91: 282-292.

Dawson, S. L., Fry, J. C. and Dancer, B. N. 2002. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent *pseudomonads*. Journal of Microbiological Methods 50: 9-22.

De Bruiji, F.J., J. Rademaker, M. Schneider, Rossbach and F.J. Louws. 1996. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. In: Biology of Plant-Microbe Interaction; Proceedings of 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interaction, pp 497-502 stacey, G., B. Mullin and P. Gresshoff (Eds.) APS Press.

De Boer, S. H. 1990. Addendum II Aplication, Bacteria. Pp. 79-86 In: Hampton, R., Ball, E., De Boer, S.(eds.). Serological methods for detection and identification of vival and bacteria plant pathogen. APS Press. St. Pual, Minnesota. USA.

Dhingra, O. D., Coelho-Netto, R. A., Rodrigues, F. A., Silva G. J. Jr., and Maia, C. B. 2006. Selection of endemic nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* from bean roots and rhizosphere competent fluorescent *Pseudomonas* species to suppress Fusarium-yellow of beans. Biological Control 39:75-86.

Duncan, N. H., Hinton, N. A., Penner, J. L., and Duncan, L. B. R. 1976. Preparation of typing antisera specific for o antigens of *Pseudomonas aeruginosa.* Journal of Clinical Microbiology 4: 124-128.

Fanelli, V., Cariddi, C., and Finetti-Sialer, M. 2007. Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. Plant Pathology 56: 683-691.

Gonzalex, A. J., Rodicio, M. R., and Mendoza, M. C. 2003. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. Applied and Environmental Microbiology 69: 2936-2941.

Goven, K., Jones, J. B., Momol, M. T., and Dickstein, E. R. 2004. Phenotypic and genetic diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola.* Journal of Phytopathology 152: 658-666.

Hao, X. J. and Xie, G. L. 2006. Internal brown rot of onion caused by an opportunistic bacterial pathogen (*Pseudomonas aeruginosa*) in China. Plant Pathology 88 (3): 339-342.

Hinrichs-Berger, J. 2003. Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pathvars associated with decline of plum trees in the Southwest of Germany. Phytopathology 152: 153-160.

Janse, J. D. 2005. Phytobacteriology principles and pratice. Plant Protection Service, Wageningen, Netherlands.

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, j. and Bleeker, M. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy .Micro-Biology 142: 1881-1893.

Kong, H. N., Blackwood, C. B., Buyer, J. S., Gulya Jr, T. J., and Lydon, J. 2006. The genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* based on the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. Biological Control 32: 356-362.

Kwon, S. W., Kim, J. S., Crowley, D. E., and Lim, C. K. 2005. Phylogenetic diversity of fluorescent pseudomonads in agricultural soils from Korea. Letters in Applied Microbiology 41: 417-423.

Lydon, J. and Patterson, C. D. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. Letters in Applied Microbiology 32: 166-170.

Marques, S. A., Marchaison, A., Gardan, L., and Samson, R. 2008. BOX-PCR based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae-P. viridiflava* group. Genetics and Molecular Biology 31: 106-115.

Mercado-Blanco, J., Rodriguez-Jurado, D., Hervas, A., and Jimenez-Diaz, R. M.2004. Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. Biological Control 30: 474-486.

Meyer, M. J., Stintzi, M., Vos, D. D., and Cornelis, P. 1997. Use of siderophores to type pseudomonads : the tree *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. Microbiology 143: 35-43.

———. 2000. Pyoverdines : pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Arch Microbiology 174: 135-142.

Milyutina, I. A., Bobrova, V. K., Matveeva, E. V., Schaad, N. W., and Troitsky, A. V. 2004. Intergenomic heterogeneity of 16S rRNA-23S rRNA internal transcribed spacer among *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas fluorescens* strains. FEMS Microbiology Letters 239: 17-23.

Moguel-Salazar, F., Quijano-Ramayo, A., Keb-Llanes, M., Moreno-Valenzuela, O., and Islas-Flores, I. 2007. Isolation of *Pseudomonas* spp. from diseased *Capsicum chinense* (Habanero pepper) plants in Yucatan, Mexico. Journal of Phytopathology 155: 470-474.

Morris, C. E., Kinkel, L. L., Xiao, K., Prior, P., and Sands, D. C. 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Infection, Genetics and Evolution 7:84-92.

Naik, P. R., Sahoo, N., Goswami, D., and Sakthivel, N. 2008. Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. Microb Ecol 56: 492-504.

Olczak-Woltman, H., Bartoszewski, G., Pluciennicak, A., and Niemirowicz-Szczytt, K. 2007. Genetic diversity of Pseudomonas syringae pv. lachrymans strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. Plant Pathology 56: 373-382.

Paez, M., Nieto, P. M., and Castillo, J. B. 2005. Siderophore producing Pseudomonas as pathogenic *Rhisoctonia solani* and *Botrytis cinerea* antagonists. Universitas Scientiarum 10: 65-74.

Romeiro, R. S., Filho, L., Vieira, J. R., Junior, H. S., Silva, A., Baracat-Pereira, M. C., and Carvalho, M. G. 2005. Macromolecules released by a plant growth-promoting Rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fugal pathogen. Phytopathology 153: 120-123.

Sazakli, E., Leotsinidis, M., Vantarakis, A., and Papapetropoulou, M. 2005. Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis. Journal of Applied Microbiology 99: 1191-1203.

Schaad, N. W. , Jones, J. B., and Chun, W. 2001. *Pseudomonas* Pp. 84-120 in: Braun-Kiewnick, A. and Sands, D. C. (eds.). Laboratory guide for identification plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

_____, Berthier-Schaad, Y., and Knorr, D. 2007. A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola.* Plant Pathology 56: 1-8.

Schneider, M., and de Bruijn, F. J. 1996. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. Word J. Microbiol. Biotechnol. 12: 164-174.

Shanmugam, v., Ajit, N. S., Verma, R., and Sharma, V. 2008. Diversity and differentiation among fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres with whole-cell protein profiles. Microbiological Research 163: 571-578.

Syrmis, M. W., Carroll, M. R., Sloots, T. P., Coulter, C., Wainwright, C. E., Bell, S. C., and Nissen, M. D. 2004. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates haboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. Journal of Medical Microbiology 53: 1089-1096.

Taguchi, F., Shimizu, R., Nakajima, R., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. 2002. Differential effects of flagellins *from Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *tomato* and *glycinea* on plant defense response. Plant Physiology and Biochemistry 41: 165-174.

Todar's online textbook of bacteriology. 2004. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.

Versalovic, J., T. Koeuth and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to DNA fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acid Research 19: 6823-6831.

Upper, C. U., Hirano, S. S., Dodd, K. K., and Clayton, M. K. 2003. Factors that affect spread of *Pseudomonas syringae* in the phyllosphere. Phytopathology 93: 1082-1092.

Yu, L., Qin, X. Y., Du, J., Wang, A. Y., Zhao, Y. Y., Shen, D. J., Sun, Y. X., and Huang, Q. 2008. Bacterial leaf spot of tobacco caused by *Pseudomonas aeruginosa* in china. Plant Pathology 57: 774-774.

Zhao, Y. F., Damicone, J. P., Demezas, D. H., Rangaswamy, V., and Bender, C. L. 2000. Bacterial leaf spot of leaf crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Plant Disease 84: 1015-1020.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

1. Carbonate coating buffer (0.05 M sodium carbonate buffer, pH 9.6)

Sodium carbonate (Na_2CO_3)	1.59	กรัม
Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	2.93	กรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.2	กรัม

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับค่า pH ด้วยสารละลาย HCl หรือ NaOH ให้ได้ 9.6 แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

Sodium chloride (NaCl)	8.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
Di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	2.9	กรัม
Potassium chloride (KCl)	0.2	กรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.2	กรัม

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับค่า pH ด้วยสารละลาย HCl หรือ NaOH ให้ได้ 7.4 แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ทำอุณหภูมิห้อง

3. PBS-T

Tween 20 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย PBS 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. Conjugate buffer

Polyvinylpyrrolidone 40T (PVP)	1.0	กรัม
Ovalbumin (egg albumin)	1.0	กรัม

นำสารมาละลายใน PBS-T ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

5. Substrate buffer, pH 9.8

Diethanolamine	100	มิลลิกรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.2	กรัม

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับค่า pH ด้วยสารละลาย HCl หรือ NaOH ให้ได้ 9.8 แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

6. Blocking solution

Bovine albumin	0.5	กรัม (5%)

นำสารมาละลายใน Coating buffer ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร (ควรเตรียมแค่พอใช้ในแต่ละครั้ง)

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

สูตรอาหารสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที นำมาเทใส่จานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

2. King's medium B (KB) (ทดสอบการสร้างสารเรืองแสง)

Proteose peptone	20.0	กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	1.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.5	กรัม
Glyceral	15.0	มิลลิลิตร
Bacto agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที นำมาเทใส่จานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

3. Anaerobic growth (Hugh and Leifson)

Proteose peptone	2.0	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
Bromothymol blue	0.03	กรัม
Bacto agar	3.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 4.5 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารพออุ่นจึงเติม 10% glucose ที่กรองด้วยหัวกรองแบคทีเรีย หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

4. Nutrient sucrose agar (NSA) (ทดสอบการสร้าง levan)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Sucrose	50.0	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที นำมาเทใส่จานอาหารที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

5. Arginine dihydrolase activity (Thornley's medium) (ทดสอบการไฮโดรไลส์ arginine)

Bacto peptone	1.0	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.0	กรัม
Di-Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.9	กรัม
Phenol red	1.0	มิลลิกรัม
L-Arginine HCl	10.0	กรัม

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับค่า pH ด้วยสารละลาย HCl หรือ NaOH ให้ได้ 7.2 แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค SDS-polyacrylamine gel electrophoresis (SDS-PAGE)

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค SDS-Polyacrylamine Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1. 30% acrylamide mix (เตรียมปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

Acrylamide 14.5 กรัม

bis-acrylamide 0.5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 30% acrylamide mix ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 1 เดือน ถ้าเกินกว่านั้นแล้ว คุณสมบัติสารจะไม่ค่อยดี ดังนั้น จึงไม่ควรเตรียมในปริมาณมากๆ และควรเก็บสารไว้ในขวดที่แสงเข้าไม่ได้ (dark bottle)
ข้อควรระวัง! Acrylamide และ bis-acrylamide เป็นสารประเภท neurotoxins สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ ควรสวมถุงมือและหน้ากากในขั้นตอนการชั่งสาร

2. 1.0 M Tris (pH 6.8) (เตรียมปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

1 M Tris (MW. = 121.14)

ถ้าต้องเตรียมสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา 121.14 กรัม ต้องการเตรียมสารละลาย 200 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา (200x121.14)/1,000 = 24.228 กรัม

ดังนั้น ต้องชั่ง Tris มา 24.23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH ด้วย HCl ให้ได้ 6.8 แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร

3. 1.5 M Tris (pH 8.8) (เตรียมปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

1 M Tris ต้องชั่งสารมา 121.14 กรัม

ต้องการเตรียม 1.5 M Tris ต้องชั่งสารมา 1.5x121.14 = 181.71 กรัม

ถ้าต้องเตรียมสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา 181.71 กรัม

ต้องการเตรียมสารละลาย 200 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา (200x181.71)/1,000 = 36.34 กรัม

ดังนั้น ต้องชั่ง Tris มา 36.34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH ด้วย HCl ให้ได้ 6.8 แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร

4. 10% ammonium persulfate (APS) (เตรียม 1,000 ไมโครลิตร)

ชั่งสารมา 100 มิลลิกรัม ใช้น้ำกลั่นละลายให้ได้ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เตรียมไว้ก่อนใช้งาน (ควรเตรียมในปริมาตรที่พอใช้ในแต่ละครั้งจะดีกว่า) ถ้าต้องการเก็บไว้ใช้ต่อ ควรเก็บสารไว้ในตู้เย็น (4 ^{0}ซ) ซึ่งเก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

5. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) (เตรียม 100 มิลลิลิตร)

ชั่งสารมา 10 กรัม ใช้น้ำกลั่นละลายให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. TEMED (N,N,N',N',-tetramethylenediamine) เก็บไว้ในตู้เย็น

7. Sample buffer

63 mMTris-HCl, pH 6.8

2% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

2% Mecaptoethanol

10% Glyceral

8. Tris-glycine electrophoresis buffer (Running buffer) (เตรียม 1,000 มิลลิลิตร)

Tris	3.02 กรัม (25 mM)
Glycine (electrophoresis grade, pH 8.3)	14.4 กรัม (250 mM)
SDS	1.0 กรัม (0.1%)

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

9. SDS gel-loading buffer

53 mM Tris, pH 6.8

100 mM dithiothreitol

2% SDS

0.1% bromophenol blue

10% glycerol

10. Coomassie brilliant blue R-250 staining solution

Coomassie brilliant blue R-250	1	กรัม (0.1%)
Methanol	500	มิลลิลิตร (50%)
Acetic acid	100	มิลลิลิตร (10%)

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ข้อควรระวัง! ควรผสม Coomassie brilliant blue R-250 และ Methanol ในน้ำกลั่นตามลำดับก่อน แล้วค่อยๆ เท Acetic acid ลงไปเป็นลำดับสุดท้าย

11. Destainning solution

Methanol	250	มิลลิลิตร (25%)
Acetic acid	75	มิลลิลิตร (7.5%)

นำสารมาละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ข้อควรระวัง! ควรผสม Methanol ในน้ำกลั่นก่อน แล้วค่อยๆ เท Acetic acid ลงไปเป็นลำดับสุดท้าย

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบและปริมาณของสารละลายในการเตรียม 12% resolving gel สำหรับ SDS-Polyacrylamine Gel Electrophoresis (Sambrook et al., 1989)

Solution components	Component volumes (ml) per gel mold volume of							
	5	10	15	20	25	30	40	50
H_2O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonum persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

ตารางภาคผนวกที่ 2 ส่วนประกอบและปริมาณของสารละลายในการเตรียม 5% Stacking gel สำหรับ SDS-Polyacrylamine Gel Electrophoresis (Sambrook et al., 1989)

Solution components	Component volumes (ml) per gel mold volume of							
	1	2	3	4	5	6	8	10
H_2O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix	0.10	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris (pH6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonum persulfate	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

ภาคผนวก ง

การเตรียม competent cell

การเตรียม competent cell

1. เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 โคโลนีเดี่ยวลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37 ^{0}ซ นานข้ามคืน
2. ดูดสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียในข้อ 1 มาปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง
3. นำสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยง เพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 ^{0}ซ นาน 10 นาที
4. ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการเติมสารละลาย 50 mM $CaCl_2$ จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 ^{0}ซ นาน 5 นาที
5. ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการเติม 50 mM $CaCl_2$ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันจะได้ competent cell ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 สำหรับนำไปเป็นเซลล์เจ้าบ้านในการรับ recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์

ภาคผนวก จ

การแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี alkaline lysis

การแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี alkaline lysis (Sambrook et al., 1989)

1. ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ถูกส่งถ่าย recombinant DNA เข้าสู่เซลล์แล้วลงในหลอดทดลองขนาด 12 เซนติเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะ amplicilin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นานข้ามคืน
2. ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียจากข้อ 1. ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
3. เทของเหลวของจากตะกอนเซลล์แบคทีเรีย แล้วเติมสารละลาย STE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
4. เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรีย แล้วเติมสารละลาย solution I ที่แช่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
5. เติมสารละลาย solution II ที่เตรียมใหม่ๆ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดแล้วพลิกกลับไป-มา เมื่อสารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำหลอดแช่ในน้ำแข็ง นาน 5 นาที
6. เติมสารละลาย solution III ที่แช่เย็นจัด ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดแล้วพลิกกลับไป-มา ประมาณ 20 ครั้ง นำหลอดแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
7. ดูดส่วนใสใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทธานอล 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 ^{0}ซ นาน 20 นาที
8. เทน้ำใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไป-มา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที (ล้าง 2 ครั้ง)
9. ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ
10. ตรวจวิเคราะห์พลาสมิด ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

ภาคผนวก ฉ
อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB medium (Luria-Bertanin medim)

Bacto-tryptone	10	กรัม
Bacto-yeat extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 5 N NaOH ให้ได้เท่ากับ 7.0 ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. SOC medium

Bacto-tryptone	20	กรัม
Bacto-yeat extract	5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
KCl	1.86	กรัม

ผสมส่วนประกอบและเติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นเติม 2 M $MgCl_2$ 5 มิลลิลิตร

3. SOB medium

เติม 1M Gluxose 20 มิลลิลิตร ในอาหาร SOB medium ปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

1. 0.5 M EDTA, pH 8.0

ละลาย Disodium ethylenediamine tetra-acetate.$2H_2O$ (EDTA) 186.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร กวนให้เข้าด้วย magnetic stirrer แล้วปรับ pH ด้วยการเติมเกล็ด NaOH ลงไปจนกระทั่งได้ pH เท่ากับ 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ นาน 15 นาที

2. 1 M Tris-HCl, pH 8.0

ละลาย Tris-base 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. 1 M NaCl

ละลาย NaCl 29.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. 5 M Potassium acetate

Potassium acetate	60	กรัม
Glacial acetic acid	28.5	กรัม
H_2O	11.5	มิลลิลิตร

5. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

6. Solution I

50 mM glucose

25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

7. Solution II (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

0.2 N NaOH

1% SDS

8. Solution III

5 M Sodium acetate	60.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	11.5	มิลลิลิตร
H_2O	28.5	มิลลิลิตร

9. STE buffer

0.1 M NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 M EDTA (pH 8.0)

10. TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 M EDTA (pH 8.0)

11. 5X TBE buffer

Tris-base	24.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 MEDTA (pH 8.0)	20.0	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

12. 50X TAE buffer

Tris-base	242.0	กรัม
Glacial acetic acid	57. 1	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100.0	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

13. Ethidium bromide (10 mg/ml)

ละลาย ethidium bromide 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กวนให้ละลายโดยใช้ magnetic stirrer จนกว่าจะละลาย เมื่อละลายดีแล้วจึงเทใส่ขวดและห่อขวดด้วย aluminium foil

ข้อควรระวัง! ในการเตรียม ethidium bromide ต้องสวมถุงมือ ระหว่างการเตรียมอย่าหายใจเอาผง ethidium bromide เข้าไประหว่างการชั่งสาร เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

14. สารละลายฟีนอลอิ่มตัว

นำฟีนอลมาทำให้ละลายด้วยการแช่ขวด phenol ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 ^{0}ซ เติม 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตรเท่ากัน เขย่าให้เข้ากันแล้วปล่อยให้แยกชั้น จึงดูด aqueous phase ชั้นบนออก สกัดซ้ำอีกครั้งด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 จนกระทั่งได้ pH ของฟีนอล > 7.8 (วัดด้วย pH paper) เติม Mercaptoethanol ให้ได้ 0.2% และเติม 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปิดทับชั้นผิวบนของ phenol

ภาคผนวก ช

สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็วโดยใช้ Biolog Identification System (Biolog™)

สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็วโดยใช้ Biolog Identification System (Biolog™)

1) สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบแกรมด้วยสารละลายด่าง (3% KOH)

ส่วนประกอบ	100	มิลลิลิตร
KOH	3	กรัม
ผสมสารเคมีในน้ำกลั่นปริมาตร	100	มิลลิลิตร

2) สารเคมีในการทดสอบ Oxidase test

ส่วนประกอบ	100	มิลลิลิตร
Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	1	กรัม
ผสมสารเคมีในน้ำกลั่นปริมาตร	100	มิลลิลิตร

3) สารละลาย Incubation fluid (GN/GP-IF)

ส่วนประกอบ	600	มิลลิลิตร
NaCl	2.4	กรัม
Pluronic acid	0.18	กรัม
Gellan gum	0.12	กรัม

ละลาย Gellan gum ในน้ำโดยใช้แท่งแม่เหล็ก stirrer และความร้อนช่วย เมื่อละลายหมดจึงเติม Sodium chloride และสุดท้ายเติม Pluronic acid เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้ว จึงแบ่งใส่หลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาววิยะดา ขันอาสา เกิดเมื่อวันที่ 5 มกราคม พ.ศ. 2520 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจากภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2543 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2550 โดยได้รับทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเผยแพร่ในรูปการประชุมวิชาการ

วิยะดา ขันอาสา และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2552. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* AR-TS003. บทคัดย่อ การสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2552. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, ประเทศไทย, หน้า 151.

วิยะดา ขันอาสา และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2552. ความหลากหลายทางชีวภาพของ fluorescent *Pseudomonas* สาเหตุโรคพืช. บทคัดย่อ การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9. อุบลราชธานี, ประเทศไทย, หน้า 93.