

รายการอ้างอิง

1. นายแพทย์สิริฤกษ์ ทรงศิริไฉ. 2543. ตับอักเสบจากไวรัส. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บางกอกบลู๊ตกรูท,
2. Srivatanakul P, Parkin DM, Khlai M, Chenvidhya D, Chotiwan P, Insiripong S, L'Abbe KA, Wild CP. Liver cancer in Thailand. II. A case-control study of hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 1991;48:329-32.
3. ยง ภู่วรรณ. 2539. ไวรัสตับอักเสบและการป้องกัน. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ ชัยเจริญ,
4. Alter MJ, Hadler SC, Margolis HS, Alexander WJ, Hu PY, Judson FN, Mares A, Miller JK, Moyer LA. The changing epidemiology of hepatitis B in the United States. Need for alternative vaccination strategies. JAMA 1990 ;263:1218-22
5. Rosenblum L, Darrow W, Witte J, Cohen J, French J, Gill PS, Potterat J, Sikes K, Reich R, Hadler S . Sexual practices in the transmission of hepatitis B virus and prevalence of hepatitis delta virus infection in female prostitutes in the United States. JAMA 1992 ;267:2477-81.
6. พิไลพันธ์ พุฒวัฒน์. ไวรัสวิทยา. กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์ อักษรสมัยกรุงเทพ, 2540: 2.8-2.9.
7. Jean-Jean O, Levrero M, Will H, Perricaudet M, Rossignol JM. Expression mechanism of the hepatitis B virus (HBV) C gene and biosynthesis of HBe antigen. Virology 1989 ;170:99-106.
8. Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. Cell 1992; 71: 663-70.
9. Truant R, Antunovic J, Greenblatt J, Prives C, Cromlish JA. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. J Virol 1995;69:1851-9.
10. Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. J Virol Methods 1998;72:163-74.
11. Kurtz JB, Alder MJ, Mayon-White RT, Juel-Jensen BE, Rodgers TM, Babic GM. Plasma-derived versus recombinant hepatitis B vaccines. Lancet 1989;25:451.
12. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. Nature 1982;298:347-50.

13. Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, Baba K, Ito Y, Miyamoto H, Funatsu G, et al. A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. Gastroenterology 1984;86:910-8.
14. Willam H.R. Edible Vaccines. Scientific American: Feature Article :September 2000.
15. Hugh S. Mason, Charles J. Arntzen. Edible vaccines-the future for paediatric vaccines delivery. Vaccines: children practice 1:13-15.
16. Blumberg BS. Australia antigen and the biology of hepatitis B. Science 1977 ;197:17-25.
17. William C, Haward T, Esteban D. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. LANCET 1993;341:349-353.
18. Yan-Hwa Wu Lee, Yao-Tsung Tung, Szecheng J. Lo. Expression and secretion of Hepatitis B viral surface antigen in *E.coli*. Biochemical and Biophysical Research Communication 1986;135:1042-1049.
19. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature 1984;307:178-80.
20. Stanley N Cohen, Annie C.Y. Chang, Leslie HSU. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Nat. Acad. Sci. USA 1972;69:2110-14.
21. รศ.นพ.ดร.สมชาย จงวุฒิเวศย์. อณูชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์ เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2541: 82-100.
22. Johson K.S, Harrison G.B.L, Lihtowler M.W, O'Hoy, Cogle W.G, Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. Nature 1989;338:585-87.
23. Charnay P, Gervais M, Louise A, Galibert F, Tiollais P. Biosynthesis of hepatitis B virus surface antigen in *Escherichia coli*. Nature 1980;28:893-5.

24. Fujisawa Y, Ito Y, Sasada R, Ono Y, Igarashi K, Marumoto R, Kikuchi M, Sugino Y. Direct expression of hepatitis B surface antigen gene in *E. coli*. Nucleic Acids Res 1983;11:3581-91.
25. Cheol-Young Maeng, Mee Sook oh, Hyo Hong. Purification and structural analysis of the hepatitis B virus PreS1 Expression from *Escherichai coli*. Biochemical and Biophysical research communication 2001;787-792.
26. Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M. Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody fab fragment against hepatitis B surface antigen. J Med Virol 1999;58:338-45.
27. Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. : Science 1995 ;268:714-6.
28. Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Dec 15;89(24):11745-9.
29. Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 ;92:3358-61.
30. Ehsani P, Khabiri A, Domansky NN. Polypeptides of hepatitis B surface antigen produced in transgenic potato. Gene 1997 Apr 29;190(1):107-11.
31. ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข. สาขาวิจัย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543:7-8.
32. Tsukahara K, Sawayama S, Yagishita T, Ogi T. Effect of Ca^{2+} channel block on glycerol levels in *Dunaliella tertiolecta* under hypoosmotic stress. J Biotechnol 1999;70:223-25.
33. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Waed WW, Prasher DC. Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression. Science 1994,263:802-805.
34. Hallmann A, Sumper M. Reporter genes and highly regulated promoter as tools for transformation experiment in *Volvox certeri*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994;91:11562-11566.
35. Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Kaew-In N, Tangkijvanich P, Hirsch P, Poovorawan Y. The predominant genotypes of hepatitis B virus in Thailand. Ann Trop Med Parasitol 1999 ;93:737-

36. H.C.Brinboim,J.Doly.A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.Nucleic Acids Research 1979; 7:1513-1523.
37. Baginski I, Chemin I, Turin F, Pichoud C, Trepo C, Hantz O. Direct cloning and expression of PCR amplified DNA and RNA sequences:application to the hepadnaviruses nucleocapsid proteins. J Virol Methods 1993 May;42(2-3):337-44.
38. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล,จวีร์รัตน์ ผลจันทร์,ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ,เผติม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ เลิศลักษณ์ เงินศิริ. การถ่ายยีนในถั่วเขียว.สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
39. Sambrook J,Fritsch E.F. Manitis T.Molecular Cloning a Laboratory Manual 2nd USA. 1987:18.47-18.48.
40. Edman JC, Hallewell RA, Valenzuela P, Goodman HM, Rutter WJ. Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in E. coli. 1981. Biotechnology 1992;24:487-90.
41. Offensperger W,Wahl S, Neurath AR, Price P, StrickN, Kent SB, Christman JK, AcsG.Expression in Escherichia coli of a cloned DNA sequence encoding the pre-S2 region of hepatitis B virus.Proc Natl Acad Sci USA 1985 ;82:7540-4.
42. Lin Y., Liu YX., Cislo T., Mason Bl., Yu MYW. Expression and Characterixation of th PreS1 Peptide of Hepatitis B Surface Antigen in *Escherichia coli*. J Med Virol 1991;33:181-187.
43. Rhyum SB, Jin BR, Park HR, Hong HJ.High level expression of hepatitis B virus preS1 peptide in Escherichia coli. J Biotechnol 1994 ;36:221-30.
44. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein.Gene 1992 ;111:229-33.
45. Anderson J M, Cormier M J.Lumisomes,the Cellular Site of Bioluminescence in Coelenterates.J Biol Chem 1973;248:2937-2943.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เทคนิค Molecular

สกัดดีเอ็นเอ(DNA Extraction)

สกัด ดีเอ็นเอ โดยวิธี phenol-chloroform ที่ 100 ไมโครลิตร ใส่ lysis buffer 400 ul และ proteinase K 10 ul incubate ที่ 50 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง สกัดด้วย phenol 250 ul และ chloroform: isoamyl อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 250 ul ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol absolute 2.5 เท่าของปริมาตรที่ incubate ที่ -70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา ครึ่งชั่วโมง บั่น 14000 รอบต่อนาทีอีก 30 นาที ล้าง ด้วย ethanol 70% แล้ว dry โดยใช้ vaccum เป็นเวลา 5 นาที ละลายด้วย 20 ul ของน้ำที่ปราศจากเชื้อ

ตัดผลิตภัณฑ์เพื่อเตรียมเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์

1. ด้วย restriction enzyme ประกอบด้วย 1xbuffer, 1xBSA, 10U Enzyme restriction enzyme, ดีเอ็นเอ 10 ไมโครกรัม ปริมาณทั้งหมด 100 ไมโครลิตร
2. incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง
3. ทำให้บริสุทธิ์ ด้วย phenol-chloroform ตกตะกอนด้วย Isopropanol, 10 เท่าของ ammonium acetate ละลายตะกอนด้วย 10 ไมโครลิตรของน้ำปราศจากเชื้อ

การฝากถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์

1. เซลล์ *E.coli* โดยแช่เซลล์ที่อยู่ในระยะล็อกเฟส คือ เซลล์เจริญเป็นเวลา 16 ชั่วโมง กับสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์เพื่อให้เซลล์พร้อมที่จะรับดีเอ็นเอ ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ competent เซลล์โดยหาค่า โคโลนีที่ขึ้นต่อปริมาณของเวกเตอร์ที่ใช้ (CFU/ug) การฝากถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* โดยวิธีของ Cohen และคณะ วิธีการคือดีเอ็นเอที่ต้องการจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ระหว่างที่ให้อุณหภูมิของเชื้อสูงเป็น 42 องศาเซลเซียส 45 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที incubate ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที
3. ใส่ SOC ปริมาตร 250 ไมโครลิตรแล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง
4. กระจายเชื้อบน LB agar (Tryptone 10 g/l, Yeast Extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, 1.2-1.5% agar) ที่มี Ampicillin ปริมาตร 50 ug/ml⁽²⁴⁾ โดยใช้ปริมาณ 50, 100, 200 ไมโครลิตร incubate

5. แยกโคโลนีเดี่ยว นำมาเลี้ยงต่อใน LB broth 50 มิลลิตร เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

สกัดพลาสมิดโดยใช้วิธี Alkaline Extractoin

1. นำเซลล์ที่เลี้ยงข้ามคืนมาปั่น 14000 ที่ 4 องศาเซลเซียส 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย 200 ไมโครลิตร lysozyme (50mM glucose, 25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10M medta, 5 mg/ml lysozyme) 200 ไมโครลิตร alkaline solution (1% SDS, 0.2N NaOH)
2. แช่น้ำแข็ง 5 นาที แล้วใส่ 200 ไมโครลิตร Potassium acetate แช่น้ำแข็ง 3 นาที
3. ปั่นที่ 14000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที
4. ดูดส่วนใสเปลี่ยนใสหลอดใหม่ ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี phenol-chloroform แล้วตกตะกอนโดยใช้ ethanol และ 3M sodium acetate ละลายตะกอนโดย TE ผสม RNase นำพลาสมิดที่สกัดได้มา run gel

การป้องกันการเชื่อมกันเองของเวกเตอร์

1. การป้องกันการเชื่อมกันเองของเวกเตอร์ โดยการทำให้ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase โดยการตั้งหมูฟอสเฟตที่ด้าน 5' ออกโดยเตรียมส่วนผสมดังนี้ 1x buffer, Enzyme 10 u, ดีเอ็นเอ, น้ำปราศจากเชื้อ ปริมาณทั้งหมด 100 ไมโครลิตร
2. นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
3. นำไป incubate ต่อที่ 55 องศาเซลเซียส 30 นาที
4. นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที
5. หยุดปฏิกิริยาโดย 10 ไมโครลิตรของ 10% SDS incubate ที่ 68 องศาเซลเซียส 15 นาที
6. ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี phenol-chloroform หลังจากนั้นให้นำมาเช็คโดยการ run gel เพื่อดูปริมาณของดีเอ็นเอที่เรามีโดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

การเชื่อมดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์

การโคลนยีนโดยพลาสมิด โดยนำ product ที่ได้จาก PCR มาเชื่อมต่อเข้ากับ เวกเตอร์โดยอัตราส่วนต่อ insert DNA เท่ากับ 1 ใน 3 ในสารละลาย 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 6 mM Tris-HCl pH 7.5, 6 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, T4 DNA ligase 4 u incubate ที่ 16 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน

การเตรียมสาร	ส่วนประกอบ
LB broth	piptone 10 g/l
	Yeast extract 5 g/l
	NaCl 10 g/l
LB agar	piptone 10 g/l
	Yeast extract 5 g/l
	NaCl 10 g/l
	Agar 1.2%
2% agarose	agarose 2 กรัม ละลายใน 1x TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
5XTBE	Tris base 27 g, Boric acid 13.75 g, EDTA 10 ml, เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 ml

CLUSTAL X (1.64b) alignment NUCLEOTIDE CLON-sample

```

CLONE          AGAGGTGCCTCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCATGGAGAACATCACATCA
sririwan      -----ATGGAGAACATCGCATCA
                                           *****
CLONE          GGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCAGGGTTTTTCTCGTTGACAAAAATCCTC
sririwan      GGATCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCAGGGTTTTTCTTGTGACAAAAATCCTC
                                           **** *****
CLONE          ACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGAAACACCC
sririwan      ACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGAAACACCC
                                           *****
CLONE          GTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCACTCACCAACCTGTTGTCCT
sririwan      GTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCACTCACCAACCTGTTGTCCT
                                           *****
CLONE          CCAATGGGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCTCTGTCATC
sririwan      CCAATGGGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCTCTGTCATC
                                           *****
CLONE          CTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGGGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTT
sririwan      CTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTT
                                           *****
CLONE          TGTCTCTAATTCCAGGATCAACAACAACCAGCACCGGACCATGCAAACCTGCACGATT
sririwan      TGTCTCTAATTCCAGGATCAACAACAACCAGCACCGGACCATGCAAACCTGCACGATT
                                           *****
CLONE          CCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAC
sririwan      CCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAC
                                           *****
CLONE          TGCAC TTGTAT TCCCAT CCCAT CATCTTGGGCTTTCGCAAATACCTATGGGAGTGGGCC
sririwan      TGCAC TTGTAT TCCCAT CCCAT CATCTTGGGCTTTCGCAAATACCTATGGGAGTGGGCC
                                           *****
CLONE          TCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTT
sririwan      TCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTT
                                           *****
CLONE          TCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTTTGGGGCCAAGTCTGTAC
sririwan      TCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTTTGGGGCCAAGTCTGTAC
                                           *****
CLONE          AACATCTTGAGTCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATT
sririwan      AACATCTTGAGTCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATT
                                           *****
CLONE          TAA
sririwan      TAA
                                           ***

```

CLUSTAL X (1.64b) adr and clon

```

adr -----ATGGAGAACACAACATCA
CLONE AGAGGTGCCTCTCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCCATGGAGAACATCACATCA
          *****

adr GGATTCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTC
CLONE GGATTCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCGGGTTTTCTTGTGACAAAATCCTC
          *****

adr ACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGAGCACCC
CLONE ACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGAAACACCC
          *****

adr ACGTGTCTGGCCCAAATTCGCAGTCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCTCT
CLONE GTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAATCTCCAGTCACTCACCAACCTGTTGTCTCT
          *****

adr CCAATTTGTCTGGCTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATC
CLONE CCAATGGGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCTCTGCATC
          *****

adr CTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTATGTTGCCCGTT
CLONE CTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTT
          *****

adr TGTCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGCACGATT
CLONE TGTCTCTAATTCCAGGATCAACAACAACCAGCACCGGACCATGCAAAACCTGCACGATT
          *****

adr CCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTCCCTCCTGTTGCTGTACAAAACCTTCGGACGGAAAC
CLONE CCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAAC
          *****

adr TGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAAGATTCCATGGGAGTGGGCC
CLONE TGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCC
          *****

adr TCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTT
CLONE TCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTT
          *****

adr TCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTAC
CLONE TCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTAC
          *****

adr AACATCTGAGTCCCTTTTACCTCTATTACCAATTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATT
CLONE AACATCTGAGTCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATT
          *****

adr TGA
CLONE TAA
          * *

```


CLUSTAL X (1.64b) sequence alignment do00630-sample

```

sample      ATGGAGAACATCGCATCAGGATCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
adr         ATGGAGAACAACAACATCAGGATCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
*****
sample      TTGTTGACAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
adr         TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
*****
sample      TTTCTAGGGGAAACACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCAC
adr         TTTCTAGGGGAGCACCCACGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAAACCTCCAATCAC
*****
sample      TCACCAACCTGTTGTCTCCAATGGGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
adr         TCACCAACCTCTTGTCTCCAATTTGTCTGGCTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
*****
sample      ATCATCTTCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
adr         ATCATATTCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAC
*****
sample      CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCAGGATCAACAACAACCAGCACCGGACCA
adr         CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACCAGCACGGGACCA
*****
sample      TGCAAAACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACA
adr         TGCAAGACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCCTGTTGCTGTACA
*****
sample      AAACCTACGGACGGAAACTGCACCTTGATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAAA
adr         AAACCTTCGGACGGAAACTGCACCTTGATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAGA
*****
sample      TACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
adr         TTCCATATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
*
sample      CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTT
adr         CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTAT
*****
sample      TGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTATACCGCTGTACCAATTTCTTT
adr         TGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTTACCTCTATTACCAATTTCTTT
*****
sample      TGTCTTTGGGTATACATTTAA
adr         TGTCTTTGGGTATACATTTGA
*****

```


CLUSTAL X (1.64b) amino acid CLON9-D000630

```

protein      -----METENTASGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGG
PROTIEN     RGASPKSDLVPRGSMETENITSGFLGPLLVLQAGFFSLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
              *****:***** **.:*****

protein      APTCPGQNSQSPTSNSHSPTSCPPIC--PGYRWMETCLRRFIIFLFILLCLIFLLVLLDY
PROTIEN     TPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLCLIFLGVLLDY
              :.* ***** *.****.***: *****

protein      HGMETLPVCPLLPSTTTSTGPKCTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPSDGNCTCIPI PSSH
PROTIEN     QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPKCTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPI PSSH
              :*****.***.:*****

protein      AFARFLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWSVGLSPTVWLSVIWMETMETWYWGPSLYNILSPF
PROTIEN     AFAKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
              ***.:*****

protein      LPLLPIFFCLWVYISTPTLIKPN
PROTIEN     IPLLPIFFCLWVYISTP-----
              :*****

```

CLUSTAL X (1.64b) alignment PROTIEN CLONE and Sample

```

PROTIENSIRIWAN -----METENIASGSLGPLLVLQAGFFLLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
PROTIEN     RGASPKSDLVPRGSMETENITSGFLGPLLVLQAGFFSLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
              *****:*** *****

PROTIENSIRIWAN TPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLCLIFLLVLLDY
PROTIEN     TPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLCLIFLGVLLDY
              *****:*****

PROTIENSIRIWAN QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPKCTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPI PSSH
PROTIEN     QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPKCTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPI PSSH
              *****:*****

PROTIENSIRIWAN AFAKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
PROTIEN     AFAKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
              *****:*****

PROTIENSIRIWAN IPLLPIFFCLWVYISTP
PROTIEN     IPLLPIFFCLWVYISTP

```

CLUSTAL X (1.64b) amino acid ADR and SIRIWAN

```

protein
PROTIENSIRIWAN METENTASGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTS
METENIASGSLGPLLVLQAGFFLLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGETPVCLGQNSQSQIS
***** ** *****:*****:*. * ***** *

protein
PROTIENSIRIWAN NHSPTSCPPIC--PGYRWMETCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYHGMETLPVCPLLP
SHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLLCLIFLLVLLDYQGMETLPVCLIPG
.***.***: ***** *****:*****:***

protein
PROTIENSIRIWAN TSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRF
STTSTGPCKTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRF
:*****:*****:*****

protein
PROTIENSIRIWAN SWLSLLVPFVQWSVGLSPTVWLSVIWMETMETWYWGPSLYNILSPFLLPIFFCLWVYI
SWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPFIPLLPIFFCLWVYI
***** *****:*****:*****

protein
PROTIENSIRIWAN STPTLIKPN
STP-----
***

```

CLUSTAL X (1.64b) alignment PROTIEN CLONE and Sample

```

PROTIENSIRIWAN -----METENIASGSLGPLLVLQAGFFLLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
PROTIEN RGASPKSDLVPRGSMETENITSGFLGPLLVLQAGFFSLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
*****.* ***** *****

PROTIENSIRIWAN TPVCLGQNSQSISSHPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLLCLIFLLVLLDY
PROTIEN TPVCLGQNSQSISSHPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLLCLIFLGVLLDY
***** *****

PROTIENSIRIWAN QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSW
PROTIEN QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSW
***** *****

PROTIENSIRIWAN AFAKYLWEWASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
PROTIEN AFAKYLWEWASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
***** *****

PROTIENSIRIWAN IPLLPIFFCLWVYISTP
PROTIEN IPLLPIFFCLWVYISTP
*****

```

CLUSTAL X (1.64b) alignment CLONE pBIS and sample

```

PBIS      -----ATGGAGAACACAACATCA
CLONE     AGAGGTGCCTCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCATGGAGAACATCACATCA
          *****

PBIS      GGATTCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCAGGGTTTTCTCGTTGACAAAAATCCTC
CLONE     GGATTCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCAGGGTTTTCTCGTTGACAAAAATCCTC
          *****

PBIS      ACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGAAACACCC
CLONE     ACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGAAACACCC
          *****

PBIS      GTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCACTACCAACCTGTTGTCCCT
CLONE     GTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCACTACCAACCTGTTGTCCCT
          *****

PBIS      CCAATGGGTCTGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTGCATC
CLONE     CCAATGGGTCTGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTGCATC
          *****

PBIS      CTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTT
CLON      CTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTT
          *****

PBIS      TGTCTCTAATTCAGGATCAACAACAACCAGCACCGGACCATGCAAAACCTGCACGATT
CLNE      TGTCTCTAATTCAGGATCAACAACAACCAGCACCGGACCATGCAAAACCTGCACGATT
          *****

PBIS      CCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAAC
CLONE     CCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGACGGAAAC
          *****

PBIS      TGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCC
CLONE     TGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCC
          *****

PBIS      TCAGTCCGTTTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTT
CLONE     TCAGTCCGTTTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTT
          *****

PBIS      TCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTTTGGGGCCAAGTCTGTAC
CLONE     TCCCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTTTGGGGCCAAGTCTGTAC
          *****

PBIS      AACATCTTGAGTCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATT
CLONE     AACATCTTGAGTCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATT
          *****

PBIS      TAA
CLONE     TAA

```


CLUSTAL X (1.64b) alignment PBIS and adr

```

PBIS      ATGGAGAACACAACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCAGGGTTTTTC
adr       ATGGAGAACACAACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCAGGGTTTTTC
          *****
PBIS      TCGTTGACAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
adr       TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
          * *****
PBIS      TTTCTAGGGGAAACACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCAC
adr       TTTCTAGGGGAGCACCCACGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAAACCTCCAATCAC
          ***** * *****
PBIS      TCACCAACCTGTTGTCCTCCAATGGGTCCCTGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCCTTTT
adr       TCACCAACCTCTTGTCTCTCCAATTTGTCCTGCTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCCTTTT
          *****
PBIS      ATCATCTTCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGGGTCTTCTGGACTAT
adr       ATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGTGTCTTCTGGACTAC
          *****
PBIS      CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCAGGATCAACAACAACCAGCACCGGACCA
adr       CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACCAGCACGGGACCA
          *****
PBIS      TGCAAAACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACA
adr       TGCAAGACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCCTGTTGCTGTACA
          *****
PBIS      AAACCTACGGACGGAAACTGCACCTTGATTTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAAA
adr       AAACCTTCGGACGGAAACTGCACCTTGATTTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAGA
          *****
PBIS      TACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
adr       TCCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
          * *****
PBIS      CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTT
adr       CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTT
          *****
PBIS      TGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTTCTTT
adr       TGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTTACCTCTATTACCAATTTTCTTT
          *****
PBIS      TGTCTTTGGGTATACATTTAA
adr       TGTCTTTGGGTATACATTTGA
          *****

```

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

```

PBIS      ATGGAGAACAACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCAGGGTTTTTC
sample    ATGGAGAACATCGCATCAGGATCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCAGGGTTTTTC
          *****
PBIS      TCGTTGACAAAAATCCTCACAATAACACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
sample    TTGTTGACAAAAATCCTCACAATAACACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
          * *****
PBIS      TTCTAGGGGAAACACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCAC
sample    TTCTAGGGGAAACACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCAAATCTCCAGTCAC
          *****
PBIS      TCACCAACCTGTTGTCCTCCAATGGGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
sample    TCACCAACCTGTTGTCCTCCAATGGGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
          *****
PBIS      ATCATCTTCCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGGGTTCTTCTGGACTAT
sample    ATCATCTTCCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
          *****
PBIS      CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCAGGATCAACAACAACCAGCACCAGGACCA
sampl     CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCAGGATCAACAACAACCAGCACCAGGACCA
          *****
PBIS      TGCAAAACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACA
samle     TGCAAAACCTGCACGATTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACA
          *****
PBIS      AAACCTACGGACGGAAACTGCACTTGTATCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAAA
sample    AAACCTACGGACGGAAACTGCACTTGTATCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAAA
          *****
PBIS      TACCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCGTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
sampl     TACCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCGTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
          *****
PBIS      CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTT
samle     CAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTCTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTT
          *****
PBIS      TGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTATACCGCTGTACCAATTTCTTT
sample    TGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTATACCGCTGTACCAATTTCTTT
          *****
PBIS      TGTCTTGGGTATACATTTAA
sample    TGTCTTGGGTATACATTTAA
          *****

```

CLUSTAL X sequence alignment protein pBIS-sample

```

PBISPRO      -----METENTTSGFLGPLLVLQAGFFSLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
PROTIENSIRIWAN -----METENIASGSLGPLLVLQAGFFLLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
                *****:*****

PBISPRO      TPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLLCLIFLGVLLDY
PROTIENSIRIWAN TPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLLCLIFLLVLLDY
                *****

PBISPRO      QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSW
PROTIENSIRIWAN QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSW
                *****

PBISPRO      AFAKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
PROTIENSIRIWAN AFAKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
                *****

PBISPRO      IPLLPIFFCLWVYISTP
PROTIENSIRIWAN IPLLPIFFCLWVYISTP
                *****

```

CLUSTAL X (1.64b) sequence alignment protien pBIS-clone *E. coli*

```

PBISPRO      -----METENTTSGFLGPLLVLQAGFFSLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
PROTIEN      RGASPKSDLVPRGSMETENITSGFLGPLLVLQAGFFSLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
                *****

PBISPRO      TPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLLCLIFLGVLLDY
PROTIEN      TPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIFLCILLLCLIFLGVLLDY
                *****

PBISPRO      QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSW
PROTIEN      QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSW
                *****

PBISPRO      AFAKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
PROTIEN      AFAKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
                *****

PBISPRO      IPLLPIFFCLWVYISTP
PROTIEN      IPLLPIFFCLWVYISTP
                *****

```


CLUSTAL X (1.64b) sequence alignment protein pBIS-D000630

```

PBISPRO      -----METENTTSGFLGPLLVLQAGFFSLTKILTIPQSLDSWWTSLNFLGE
protien      -----METENTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGG
                ***** **.:*****

PBISPRO      TPVCLGQNSQSQISSHSPTCCPPMETGPGYRWMETCLRRFIIIFLCILLCLIFLGVLLDY
protien      APTCPGPNQSPSTSNHSPTSCPPIC--PGYRWMETCLRRFIIIFLIFLLCLIFLLVLLDY
                :*. * * * * * *.*****.***: *****

PBISPRO      QGMETLPVCPLIPGSTTTSTGPKCTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSW
protien      QGMETLPVCPLLPGTSTTSTGPKCTCTIPAQGTSMETFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSW
                *****:*.:.*****

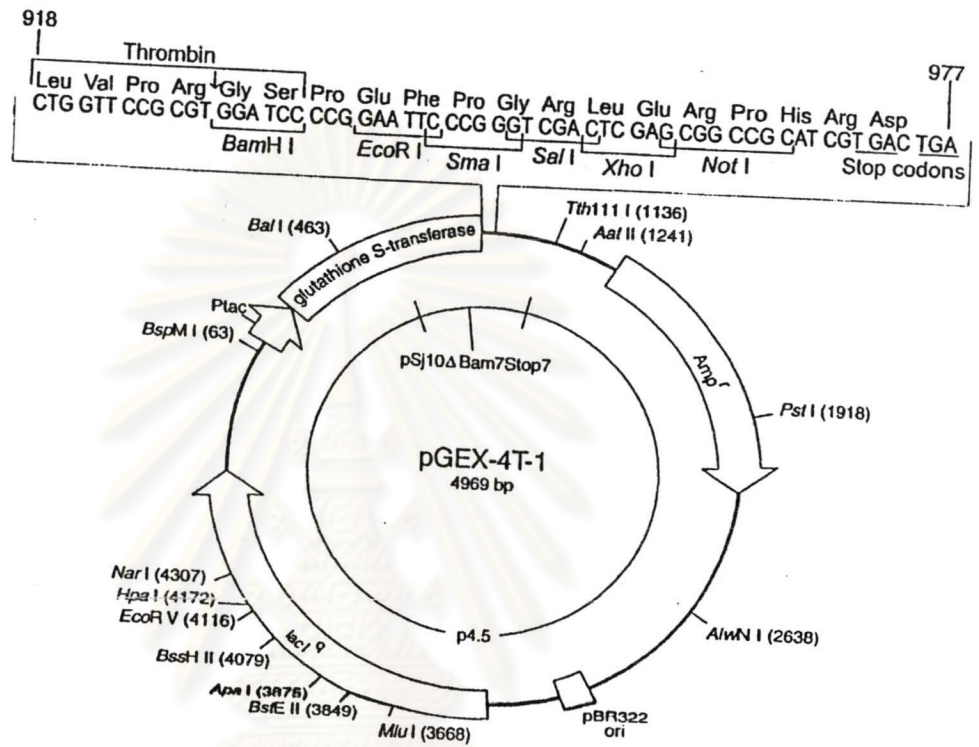
PBISPRO      AFAKYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWVGLSPTVWLSVIWMETMETWFWGPSLYNILSPF
protien      AFARFLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWVGLSPTVWLSVIWMETMETWYWGPSLYNILSPF
                ***.:*****

PBISPRO      IPLLPIFFCLWVYISTP
protien      LPLLPIFFCLWVYISTP
                :*****

```



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



พลาสมิด pGEX

- ยีนต้านแอมพิซิลิน
- มีส่วนเริ่มในการจำลองตัวเอง
- โปรตีนเชื่อมซึ่งสามารถแยกออกได้โดยนำ trombin trotease

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพจนานถ จันทร์ศรีมี เกิดวันที่ 25 กันยายน พ.ศ. 2517 ที่อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีที่วชิรวิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทาลัยรามคำแหง ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2545



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย