ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. H agar

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Peptone	5	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	20	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	5	กรัม
Arabinose (0.5 g/ml)	20	มิลลิลิตร
Cresol red (0.2%)	20	มิลลิลิตร
Sodium pyruvate (#)	1	กรัม
Agar	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 8.2

มีคุณสมบัติช่วย recover cell ที่บาดเจ็บใน speciesmen

การเตรียม: ผสมส่วนผสมทั้งหมดข้างต้นในน้ำกลั่น ยกเว้น arabinose ปรับ pH เป็น 8.2 ต้มด้วยไฟอ่อนๆ นำไป sterile ด้วยการ Autoclave เมื่ออุณหภูมิลดลง เติม arabinose ผสมให้เข้ากัน และเทใส่จานอาหารปราศจากเชื้อ

2. LB (Luria Bertani)

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

การเตรียม: ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ เทใส่หลอด นำไป sterile ด้วยการ Autoclave

3. Maltose agar

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Phenol red broth base	16	กรัม
Sodium chloride	20	กรัม
Maltose	5	กรัม
Agar	15	กรัม

การเตรียม: ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ นำไป sterile ด้วยการ Autoclave และเทใส่จานอาหารปราศจากเชื้อ

4. Mannitol Maltose agar

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Polypeptone	1	มิลลิลิตร
Beef extract	5	กรัม
Papaic digest of soybean meal	5	กรัม
NaCl	20	กรัม
D-Mannitol	10	กรัม
Maltose	10	กรัม
Agar	13	กรัม
Dye stock solution,1000x	1	มิลลิลิตร

pH 8.2 $\pm$ 0.2 at 25 °C

Dye Stock Solution, 1000x

Bromthymol Blue	4	กรัม
Cresol Red	4	กรัม
Ethanol, 95%	100	ml

การเตรียม Dye Stock Solution

เติม Bromthymol Blue และ Cresol Red ลงในเอทานอล ผสมให้เข้ากัน

การเตรียม: ผสมส่วนผสมข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.2 ต้มด้วยไฟอ่อนๆ นำ นำไป sterile ด้วยการ Autoclave และเทใส่จานอาหารปราศจากเชื้อ

5. Sporosarcina halophilla agar

ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Peptone	5	กรัม
Beef extract	1	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
NaCl	30	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	5	กรัม
Agar	20	กรัม

pH 7.2 $\pm$ 0.2 at 25 °C

การเตรียม: ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ นำไป sterile ด้วยการ Autoclave และเทใส่จานอาหารปราศจากเชื้อ

ภาคผนวก ข.

1. การเตรียมสารละลาย

1.1) บัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรโฟเรซิส (10 x TBE)

ชั่ง Tris base 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ลงไป 40 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เมื่อเวลาจะใช้ให้เจือจางในระดับความเข้มข้น 1:10

1.2) Tris EDTA (TE)

ผสมสารละลาย 10 mM Tris-HCl และสารละลาย 1 mM EDTA โดยการละลาย Tris-HCl จำนวน 1.211 กรัมในน้ำกลั่น และเติมสารละลาย 0.5 M EDTA ลงไป 1 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร sterile ด้วยการ Autoclave

1.3) Denaturation solution

ผสมสารละลาย 1.5 M NaCl และสารละลาย 0.5 M NaOH โดยการละลาย NaCl จำนวน 87.66 กรัมในน้ำกลั่น และละลาย NaOH จำนวน 20 กรัมในน้ำกลั่น ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร sterile ด้วยการ Autoclave

1.4) Neutralization solution

ผสมสารละลาย 1.5 M NaCl สารละลาย 0.5 M Tris-HCl pH 7.2 และสารละลาย 0.001 M EDTAโดยการละลาย NaCl จำนวน 87.75 กรัมในน้ำกลั่น แล้วละลาย Tris-HCl จำนวน 60.57 กรัมในน้ำกลั่น ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน และเติม 0.5 M EDTA ลงไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร sterile ด้วยการ Autoclave

1.5) สารละลาย 20 x SSC

ผสมสารละลาย 6 M NaCl และ 0.3 M Sodium citrate ให้เข้ากันโดยการละลาย NaCl 175.3 กรัม ในน้ำกลั่นและละลาย Sodium citrate 88.2 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1.0 N NaOH และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร sterile ด้วยการ Autoclave

1.6) สารละลายบัฟเฟอร์ 1

ผสมสารละลาย 0.1 M maleic acid และสารละลาย 0.15 M NaCl ให้เข้ากันโดยการละลาย maleic acid จำนวน 11.607 กรัมในน้ำกลั่น และละลาย NaCl จำนวน 8.766 กรัมในน้ำกลั่น ผสมเข้าด้วยกัน ปรับ pH เป็น 7.5 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร sterile ด้วยการ Autoclave

1.7) Blocking stock solution

ชั่ง blocking reagent แล้วละลายใน สารละลายบัฟเฟอร์ 1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% (w/v)

1.8) Hybridization solution

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

formamide	50	มิลลิลิตร
20 x SSC	25	มิลลิลิตร
10% blocking reagent	20	มิลลิลิตร (จากข้อ 1.7)
10% SDS	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

1.9) สารละลายบัฟเฟอร์ 2

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

blocking stock solution (จากข้อ 1.9)	10	มิลลิลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ 1	90	มิลลิลิตร

1.10) สารละลายบัฟเฟอร์ 3

ผสมสารละลาย 100 mM Tris-HCl สารละลาย 100 mM NaCl และสารละลาย 50 mM $MgCl_2$ ให้เข้ากันโดยการละลาย Tris-HCl จำนวน 12.114 กรัม ในน้ำกลั่น ละลาย NaCl จำนวน 5.844 กรัม ในน้ำกลั่น และละลาย $MgCl_2$ 1.215 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH เป็น 9.5 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร sterile ด้วยการ Autoclave

1.11) สารละลายบัฟเฟอร์ 4

ผสมสารละลาย 10 mM Tris HCl และสารละลาย 1 mM EDTA ให้เข้ากันโดยการละลาย HCl จำนวน 1.211 กรัม ในน้ำกลั่น และละลาย EDTA จำนวน 0.372 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร sterile ด้วยการ Autoclave

2. การเตรียมเอนไซม์

2.1) เอนไซม์ RNase (10 mg/ml)

ชั่งเอนไซม์ RNase 100 mg มาละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 15 mM sodium chloride ปริมาตร 10 ml ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

ภาคผนวก ค.

Biochem test for *V. hollisae*

TSI	K/A^-
oxidase	+
indole	+
motile	-
lysine decarboxylase	-
ornithine decarboxylase	-
arginine dihydrolase	-
sucrose	-
glucose	+
galactose	+
mannitol	-
mannose	+

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวอังคณา ใสเกื้อ

วัน เดือน ปี เกิด 8 เมษายน 2519

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยทักษิณ อ. เมือง จ. สงขลา	2540

ทุนการศึกษาระหว่างเรียน

ทุนผู้ช่วยสอน

แถวที่1 Marker (λ *Hind*III และ ϕ x *Hae*III)

แถวที่2 โครโมโซมอลดีเอนดีเอนเอของ *V. hollisae* 1613

แถวที่3 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1614

แถวที่4 พลาสมิดของ *V. hollisae* 1614

แถวที่5 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1615

แถวที่6 พลาสมิดของ *V. hollisae* 1615

แถวที่7 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1616

แถวที่8 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1617

แถวที่9 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1618

แถวที่10 พลาสมิดของ *V. hollisae* 1618

แถวที่11 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1619

แถวที่12 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1626

แถวที่13 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1627

แถวที่14 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 1628

แถวที่15 โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* 3209

แถวที่16 พลาสมิดของ *V. hollisae* 3209

แถวที่1	Marker (λ *Hind*III และ ϕ x *Hae*III)
แถวที่2	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1613
แถวที่3	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1614
แถวที่4	พลาสมิดของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1614
แถวที่5	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1615
แถวที่6	พลาสมิดของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1615
แถวที่7	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1616
แถวที่8	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1617
แถวที่9	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1618
แถวที่10	พลาสมิดของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1618
แถวที่11	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1619
แถวที่12	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1626
แถวที่13	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1627
แถวที่14	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1628
แถวที่15	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 3209
แถวที่16	Control (phage Vf1)

แถวที่1	Marker (λ *Hind*III และ ϕ x *Hae*III)
แถวที่2	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1613
แถวที่3	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1614
แถวที่4	พลาสมิดของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1614
แถวที่5	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1615
แถวที่6	พลาสมิดของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1615
แถวที่7	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1616
แถวที่8	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1617
แถวที่9	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1618
แถวที่10	พลาสมิดของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1618
แถวที่11	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1619
แถวที่12	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1626
แถวที่13	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1627
แถวที่14	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1628
แถวที่15	โครโมโซมอลดีเอนเอของ *V. hollisae* สายพันธุ์ 3209
แถวที่16	Control (phage Vf2)

แถวที่1	Marker (ϕ x *Hae*III)
แถวที่2	*V. hollisae* 1613
แถวที่3	*V. hollisae* 1614
แถวที่4	*V. hollisae* 1615
แถวที่5	*V. hollisae* 1616
แถวที่6	*V. hollisae* 1617
แถวที่7	*V. hollisae* 1618
แถวที่8	*V. hollisae* 1619
แถวที่9	*V. hollisae* 1626
แถวที่10	*V. hollisae* 1627
แถวที่11	*V. hollisae* 1628
แถวที่12	*V. hollisae* 3209
แถวที่13	*V. parahaemolyticus*
แถวที่14	*V. cholerae*