

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria Bertani Agar (LA)

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g
Agar	15	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1	L
pH 7.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที รอจนอุณหภูมิของอาหารลดลง เหลือประมาณ 55 °C จึงนำมาเติม ampicillin ให้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 100 µg/ml ก่อนเทลงบนจานอาหาร

2. Luria Bertani Broth (LB)

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1	L
pH 7.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. 50X TAE buffer

Tris-base	242	g
Glacial acetic acid	57.1	ml
0.5 M EDTA	100	ml
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1	L
pH 8.0		

ละลาย Tris-base และ 0.5 M EDTA ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม Glacial acetic acid ลงไป (ทำในตู้ควั่น) คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

2. 0.5 M Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)

EDTA	186.1	g
NaOH	20	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1	L
pH 8.0		

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH 8.0 ซึ่ง EDTA จะละลายหมดพอดี (EDTA จะไม่ละลายถ้า pH ต่ำกว่า 8.0) ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3. Ethidium bromide

5mM EtBr	60	μl
TAE buffer	250	ml

ละลาย EtBr ใน 1X TAE buffer ผสมให้เข้ากัน เก็บให้พ้นแสงที่ 4 °C

ภาคผนวก ค

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่าง

1. ลำดับเบสของตัวอย่างที่ได้จากการทดลอง (แฉวบน) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ Israel acute paralysis virus จากฐานข้อมูล (แฉวล่าง)

> gb|EF219380.1|Israel acute paralysis virus of bees, complete genome
Length=9499
Score = 756 bits (838), Expect = 0.0
Identities = 434/444 (97%), Gaps = 0/444 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 2      CCAGAGGGTTGACTGTGTGTCATCATATACACGGAGTCATTGCAGATGTGTACAGAATTA 61
             |||
Sbjct 5809    CCAGAGGGTTGGCTGTGTGTCATCATATACACGGAGTCATTGCAAATGTGTACAGAATTG 5750

Query 62      TACACATCCATCAACAACACGTGTCTGATCAGATTATTTTCTTTCCATCATCATAAAAC 121
             |||
Sbjct 5749    TACACATCCATCAACAATACGTGTCTGATCAGATTATTTTCTTTCCATCATCATAAAAC 5690

Query 122     TCATTCGCTAAATCTGCAAATTTTCCATAATACATACATTCAAGTATCCATCAAAAGTT 181
             |||
Sbjct 5689    TCATTCGCTAAATCTGCAAATTTTCCATAATACATACATTCAAGTATCCATCAAAAGTT 5630

Query 182     GAAAAATCACCTGCAATAACTTTATTTCCGAATTTGGTTAACTTGCGAACAGTTTACTC 241
             |||
Sbjct 5629    GAAAAATCACCTGCAATAACTTTATTTCCAAATTTAGTCAACTTACGAACAGTTTACTC 5570

Query 242     CAATCCTGAGAATACACATTTCGTTCCAATGGACACCTCATTAGTAATTCGATTTTCCATC 301
             |||
Sbjct 5569    CAGTCTTGAGAATACACATTTCGTTCCAATGGACACCTCATTAGTAATTCGATTTTCCATC 5510

Query 302     AAATGAGCTATAAAGCCCAAATAATACATTCGAAAAGCTATAGAGAAATCCATTGGTCCA 361
             |||
Sbjct 5509    AAATGAGCTATAAAGCCCAAATAATACATTCGAAAAGCTATAGAGAAATCCATTGGTCCA 5450

Query 362     TTTGAGAATACTCGTGTTCATTTCAATTGATTAACTTTTTCAATGGGTCGACGCTCATCTTTC 421
             |||
Sbjct 5449    TTTGAGAATACTCGTGTTCATTTCAATTGATTAACTTTTTCAATGGGTCGACGCTCATCTTTC 5390

Query 422     AATGTATCAACCCACATTACAGGT 445
             |||
Sbjct 5389    AATGTATCAACCCACATTACAGGT 5366
```

2. ลำดับเบสของตัวอย่างที่ได้จากการทดลอง (แฉวนบน) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ Deformed wing virus จากฐานข้อมูล (แฉวนล่าง)

> emb|AJ489744.2|DWI489744 Deformed Wing Virus gene for polyprotein, genomic RNA
Length=10140
Score = 627 bits (339), Expect = 1e-176
Identities = 373/395 (94%), Gaps = 0/395 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      TTTGCAAGATGCTGTATGTGGTGTGCCTGGTTTAGATGGGTTTGATTGATATCTTGAA 60
            |||
Sbjct 8566   TTTGCAAGATGCTRTATGTGGTGTGCCTGGTTTAGATGGGTTTGATTGATATCTTGAA 8625

Query 61     TACTAGTGCTGGTTTTCTTTGTCTTCATTAAGCCACCTGGAACATCAGGTAAGCGGTG 120
            |||
Sbjct 8626   TACTAGTGCTGGTTTTCTTTGTCTTCATTAAGCCACCTGGAACATCAGGYAAGCGATG 8685

Query 121    GCTGTTTGATATTGAGCTTCAAGATTCGGGATGTTATCTATTGCGTGGAATGCGTCCCGA 180
            |||
Sbjct 8686   GTTGTTTGAYATTGAGCTACAAGAYTCGGGATGTTATCTCYTGCGTGGAATGCGTCCCGA 8745

Query 181    ACTTGAAATTCAATTGTCGACAACACAGTTAATGAGGAAAAAGGGAATAAAGCCTCACAC 240
            |||
Sbjct 8746   ACTTGAGATTCAATTATCAACGACACAGTTAATGAGGAAAAAGGGAATAAAGCCTCACAC 8805

Query 241    TATATTCACAGATTGTCTGAAAGATACTTGTTTGCCTGTTGAAAAATGCAGAATACCTGG 300
            |||
Sbjct 8806   TATATTCACGATTGTTTGAAAGATACTTGTTTGCCTGTTGAAAAATGTAGAATACCTGG 8865

Query 301    TAAACTAGAAATATTTAGTATAAGTCCTGTACAGTTCACTATACCGTTTCGACAGTATTA 360
            |||
Sbjct 8866   TAAGACTAGAAATATTTAGTATAAGTCCTGTACAGTTTACCATACCGTTTCGACAGTATTA 8925

Query 361    CTTAGATTTTATGGCATCCTATCGAGCTGCACGAC 395
            |||
Sbjct 8926   CTTAGACTTTATGGCATCCTATCGAGCTGCACGAC 8960

```

3. ลำดับเบสของตัวอย่างที่ได้จากการทดลอง (แฉวนบน) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ Kashmir bee virus จากฐานข้อมูล (แฉวนล่าง)

```
> gb|AF197908.1|AF197908 Kashmir bee virus isolate 990806B-22 RNA polymerase
gene, Partial cds
Length=414
Score = 662 bits (358), Expect = 0.0
Identities = 398/414 (96%), Gaps = 15/414 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GATGAACGTCGACCTATTGAAAAAGTTAATCAATTGAAAACACGAGTATTCTCAAATGGA 60
|||||
Sbjct 1      GATGAACGTCGACCTATTGAAAAAGTTAATCAATTGAAAACACGAGTATTCTCAAATGGA 60

Query 61     CCAATGGATTTCTCTATAGCTTTTCGAATGTATTATTTGGGCTTTATAGCTCATTT-ATG 119
|||||
Sbjct 61     CCAATGGATTTCTCTATAGCTTTTCGAATGTATTATTTGGGCTTTATAGCTCATTTGATG 120

Query 120    GAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATTGGA-CGAATGTGTATTCTCAGGA-TGGAGT 177
|||||
Sbjct 121    GAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATTGGAACGAATGTGTATTCTCAAGACTGGAGT 180

Query 178    AAAACTGTTCG-AA-TT-ACCAAATT-GGAAATAA-GTTATTGCAGGTGATTTTTCAACT 232
|||||
Sbjct 181    AAAACTGTTCGCAAGTTGACCAAATTTGGAAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTTCAACT 240

Query 233    TTTGATGGATCACTGAATGTATGTATTATGGAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTT 292
|||||
Sbjct 241    TTTGATGGATCACTGAATGTATGTATTATGGAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTT 300

Query 293    TATGATGATGGAAAAGAAA-TAATCTGATCAGACACGT-TTGTTGATGGATGTGTA-A-T 348
|||||
Sbjct 301    TATGATGATGGAAAAGAAAATAATCTGATCAGACACGTGTTGTTGATGGATGTGTACAAT 360

Query 349    TCTGTACA-ATCTG-AATGACTC-GTGTATATGATGACTCATAGCCAACCCACA 399
|||||
Sbjct 361    TCTGTACATATCTGCAATGACTCCGTGTATATGATGACTCATAGCCAACCCACA 414
```

4. ลำดับเบสของตัวอย่างที่ได้จากการทดลอง (แฉวนบ) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ Sacbrood virus จากฐานข้อมูล (แฉวล่าง)

>gb|AF092924.1|AF092924 Sacbrood virus complete genome
 Length=8832
 GENE ID: 1450776 pol | polyprotein [Sacbrood virus]
 Score = 593 bits (321), Expect = 2e-166
 Identities = 391/426 (91%), Gaps = 0/426 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1      GGATGAAAGGAAATTACCAGAGAAAGTACGCAAGTATGGTGGAACCTCGGGTGTGTTTGTAA 60
          |||
Sbjct 7747   GGATGAAAGGAAATTACCAGAAAAAGTACGAAAGTATGGTGGAACCCGAGTGTTTGTAA 7806

Query 61     TCCTCCTATCGATTACATTGTGTGATGAGGCAATATTATATGCATTTTGTGCTGCGTT 120
          |||
Sbjct 7807   CCCTCCTATCGATTATATTGTATCAATGAGGCAATATTATATGCACTTTGTGCTGCATT 7866

Query 121    TATGGAACAGCGTTTTAAGTTGATGCATGCAGTGGGGATTAATGTTTCAGAGTACAGAGTG 180
          |||
Sbjct 7867   TATGGAACAGCGTTTTAAGCTAATGCATGCAGTGGGAATTAATGTTTCAGAGTACAGAGTG 7926

Query 181    GACGCTTTTGGCTTCCAAGTTACTCGCGAAAGGAAATAATTTGTACTATTGATTATTC 240
          |||
Sbjct 7927   GACGCTTTTAGCTTCTAAGTTGCTAGCGAAAGGGAATAACATTTGCACCATTGATTATTC 7986

Query 241    AAATTTTCGGTCCAGGTTTTAATGCTCAAATAGCGAAAGCTGCCATGGAATTAATGGTGCG 300
          |||
Sbjct 7987   AAATTTTGGTCCGGGTTTTAATGCTCAAATAGCGAAAGCTGCTATGGAATTAATGGTGCG 8046

Query 301    GTGGACTATGGAGCATGTTGAAGGTGTAAATGAGGTAGAGGCGTATACCTTATTGCATGA 360
          |||
Sbjct 8047   GTGGACTATGGAGCATGTTGAGGGCGTAAACGAGATAGAGGCGTATACTTTATTACATGA 8106

Query 361    GTGCTTAAATTCAGTCCACTTAGTATCTAATACGCTGTACCAGCAAAAGTGTGGATCACC 420
          |||
Sbjct 8107   GTGTTTAAATTCAGTCCACTTAGTGTCTAATACGCTGTACCAACAAAAGTGTGGATCACC 8166

Query 421    TAGTGG      426
          |||
Sbjct 8167   TAGTGG      8172
  
```

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวศิริกาญจน์ สันปา

วัน เดือน ปีเกิด 17 มีนาคม 2526

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2547

สถานที่ติดต่อ 305/15 หมู่ 4 ถนน สันทราย-พร้าว ตำบลสันทรายน้อย
อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50210

โทรศัพท์ 089-8350521

E-mail address a_sanpa@hotmail.com

การนำเสนอผลงานทางวิชาการระหว่างการศึกษ

2550 นำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์ และบทความเรื่อง “Bee viruses in Thai honey bee” การประชุมวิชาการ The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology วันที่ 9-12 ตุลาคม 2550 ณ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี

ผลงานการตีพิมพ์ทางวิชาการ

Sanpa, S. and Chantawannakul, P. 2009. Survey of Six Bee Viruses Using RT-PCR in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*. 100, 116-119.