บันทึกข้อความ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สถาบันวิจัยและพัฒนา
รับที่ 426/48
วันที่ 24 มี.ค. 2547
เวลา 10.30 น.

หน่วยงาน สถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 4198 โทรสาร 4185
ที่ ศธ 5611(14)/046 วันที่ 24 มีนาคม 2548
เรื่อง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

---

(1) เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

สถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ใคร่ขอส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง **การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283** ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 ของ **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์ จำนวน 25 เล่ม** มาพร้อมนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และพิจารณาดำเนินการต่อไป

(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวณีย์ รัตนพานี)
หัวหน้าสถานวิจัย
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

(2) เรียน ผศ. ดร. สิทธิชัย แสงอาทิตย์
เพื่อโปรดพิจารณา

(ผศ. ดร. สิทธิชัย แสงอาทิตย์)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
24 มี.ค. 2548

(3) เรียน ผู้อำนวยการ
ขอส่งรายงานวิจัย 25 เล่ม
เพื่อนำเสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ต่อไป
ด้วย ความเคารพ
ขอแสดงความนับถือ
ไม่ทราบ

(4) ส่งแล้ว 25 เล่ม
25/3/48

บันทึกข้อความ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ฝ่ายประสานงานการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา โทร. 4753 โทรสาร 4750

หน่วยงาน.....

ที่ ศธ 5621/ ๖๗ วันที่ ๓๑ มกราคม 2548

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาร่างรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์

เรียน หัวหน้าสถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ตามที่ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์ ได้ส่งร่างรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง " *การแยกยีนไคติเนส จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล Vibrio alginolyticus สายพันธุ์ 283* " เพื่อเสนอคณะอนุกรรมการพิจารณากลั่นกรองและจัดสรรงบประมาณโครงการวิจัยนั้น ผลการพิจารณาของคณะอนุกรรมการฯ มีมติรับรองร่างรายงานฯ ดังกล่าว โดยให้แก้ไขปรับปรุงด้านการพิมพ์ตามที่ระบุในร่างรายงานการวิจัย และให้เพิ่มเติมการวิจารณ์ผลการวิจัย (เนื่องจากในร่างรายงานมีเฉพาะสรุปผลการวิจัยซึ่งควรวิจารณ์เปรียบเทียบกับผลงานอื่นๆ ที่ใกล้เคียงที่ผ่านมา)

ในการนี้สถาบันวิจัยและพัฒนา จึงใคร่ขอความร่วมมือจากท่านในการแจ้งหัวหน้าโครงการวิจัยดังกล่าวส่งเอกสารที่เกี่ยวข้องให้สถาบันวิจัยและพัฒนา ภายในวันที่ **28 กุมภาพันธ์ 2548** ตามรายการดังนี้

1. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ที่แก้ไขตามข้อเสนอแนะของคณะอนุกรรมการฯแล้ว จำนวน 25 เล่ม (เพื่อนำไปเผยแพร่ให้หน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้องต่อไป กรณีที่มีข้อจำกัดในการเผยแพร่ โปรดแจ้งให้สถาบันวิจัยและพัฒนา ทราบโดยด่วนด้วย)
2. *diskette ที่ copy file ข้อมูลบทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ จำนวน 1 แผ่น*
3. รายงานการใช้จ่ายเงินงวดสุดท้าย (ตามแบบ สบวพ.-ง-02)
4. หลักฐานใบเสร็จรับเงินที่เกิดจากการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ
5. กรณีที่มีการใช้จ่ายเงินอุดหนุนการวิจัยในการซื้อครุภัณฑ์ หรือหนังสือ ต้องส่งครุภัณฑ์หรือหนังสือดังกล่าวคืนสถาบันวิจัยและพัฒนาด้วย
6. สำเนาบัญชีเงินฝากของโครงการวิจัยเฉพาะหน้าที่มีการเคลื่อนไหวของเงิน (เพื่อตรวจสอบเบื้องต้น โดยสถาบันวิจัยและพัฒนา จะแจ้งให้หัวหน้าโครงการวิจัยทราบอีกครั้งเพื่อดำเนินการโอนเงินคงเหลือและดอกเบี้ยที่เกิดขึ้นทั้งหมดให้มหาวิทยาลัยต่อไป)

(สำหรับรายละเอียดในข้อ 3-6 โปรดสอบถามเพิ่มเติมที่ฝ่ายธุรการของสถาบันฯ โทร.4750)

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบและโปรดแจ้งให้หัวหน้าโครงการวิจัยดำเนินการต่อไปด้วยจักขอบคุณยิ่ง พร้อมนี้สถาบันวิจัยและพัฒนา ได้ส่งคืนร่างรายงานฯ จำนวน 5 เล่ม มาด้วยแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธิชัย แสงอาทิตย์)

รักษาการแทนผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

สำเนาเรียน ฝ่ายธุรการ สถาบันวิจัยและพัฒนา

รหัสโครงการ SUT1-102-44-12-44

รายงานการวิจัย

? Isolation of Chitinase A gene from ——

การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283

Gene Isolation of Chitinase A from a Marine Bacterium, *Vibrio alginolyticus* strain 283

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-44-12-44

รายงานการวิจัย

การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283

Gene Isolation of Chitinase A from a Marine Bacterium, *Vibrio alginolyticus* strain 283

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2547

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผศ. ดร. วิภา สุจินต์
อาจารย์สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดยีนไคติเนสจากจีโนมของเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 โดยทำการเตรียมชิ้นของดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3IA ขนาด 3-8 kb และตรวจหายีนไคติเนสโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies เป็นตัวตรวจจับ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนไคติเนส ด้วย SDS-PAGE และ immunoblotting ของชิ้นดีเอ็นเอที่นำเข้าสู่พลาสมิด pBluescript II KS(-) และแบคทีเรีย DH5α พบว่าโคลน GC1-GC6 ที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสเป็นองค์ประกอบ การทำแผนที่ดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลาย ๆ ชนิด พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 มีขนาด >10 kb และพบว่าการตัดชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ *Kpn*I ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กลงเหลือ 7 kb การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE การทำ immunoblotting และการหาแอคติวิตี้โดยใช้ glycol chitin เป็นสับสเตรทแสดงให้เห็นว่ายีนไคติเนสที่สกัดได้สามารถสร้างโปรตีนขนาด 63 kD การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์บางส่วนพบว่า ลำดับนิวคลิโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 ที่ย่อยด้วย *Kpn*I มีความเหมือนกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนส เอ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae* คือ 98.3%

Abstract

In this research we describe isolation of a chitinase gene from genomic DNA of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* strain 283. The 3-8 kb DNA sizes were prepared by digesting with *Sau*3AI and a chitinase gene was detected immunologically using anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies as a probe. SDS-PAGE and immunoblotting of all the generated DNA fragments, which were cloned into the pBluescript II KS(-) plasmid and transformed into DH5α host cells, suggested that clones GC1-GC6 carried a DNA insert containing a chitinase gene. Analysis of DNA mapping with different restriction enzymes suggested that clone GC6 carried a DNA insert of ~10 kb. This insert was reduced to 7 kb when digested with *Kpn*I. As revealed by SDS-PAGE, immunoblotting, and chitinase assay on native PAGE using glycol-chitin as substrate, the *Kpn*I-digested DNA could express a 63-kDa protein, which highly corresponded to chitinase A isolated from *V. carchariae*. Partial nucleotide sequencing showed that nucleotide sequence of the isolated gene was 98.3% identical to that of *V. carchariae* chitinase A.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	4
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผลการทดลอง	9
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	17
ข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	21
ภาคผนวก ข	23
ประวัติผู้วิจัย	24

สารบัญภาพ

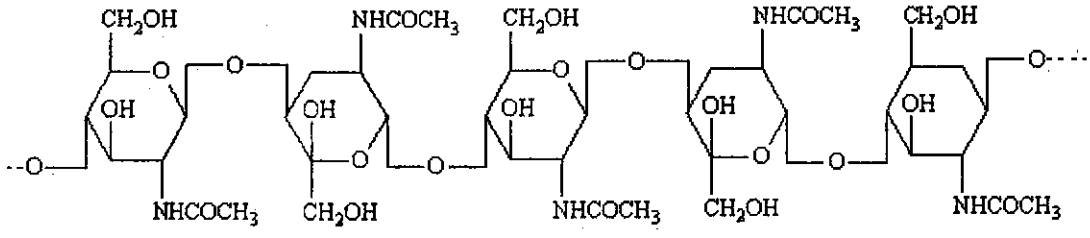
หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์ 1
รูปที่ 2 แสดงจีโนมที่สกัดจากเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283 9
รูปที่ 3A แสดงขนาดและปริมาณของจีโนมที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
เป็นเวลา 120 นาที ที่ 37°C 10
รูปที่ 3B แสดงขนาด genomic DNA (3-8 kb) หลังจากถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
และทำการสกัดด้วย Qiagen DNA Extraction kit..... 11
รูปที่ 4 โคโลนีที่ให้ผลบวกกับ anti-chitinase A antibodies หลังจากทำ colony lift
ครั้งที่ 2..... 12
รูปที่ 5A SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน GC1-GC6..... 13
รูปที่ 5B Immunoblotting แสดงการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน GC1-GC6..... 13
รูปที่ 6A SDS-PAGE แสดงการสร้างโปรตีนไคติเนสโดยโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I..... 14
รูปที่ 6B Immunoblotting แสดงการสร้างแอนติเจนไคติเนสโดยโคลน GC6 ที่ตัดด้วย
*Kpn*I ที่จำเพาะต่อ anti-chitinase A antibodies..... 15
รูปที่ 6C Native PAGE ของโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I ที่ย้อมด้วย glycol chitin..... 15
รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน GC6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีนไคติเนส เอ ของเชื้อ *V .carchariae*..... 16

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ที่เรียกว่า *N*-acetylglucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคลซิดิกที่ตำแหน่ง β1→4 ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์

ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 10^{10} ถึง 10^{11} ตันต่อปี[1] ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเภสัชกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ

เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร เช่นอาหารทะเลแช่แข็ง อาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมข้างเคียงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะนี้การย่อยสลายไคตินโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมี ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิกิริยาการย่อยสลาย

ในธรรมชาติการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์สามตัวด้วยขั้นตอนหลัก ๆ คือไคตินโพลีเมอร์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เอนโดไคติเนสให้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์ หลังจากนั้นโอลิโกเมอร์จะถูกย่อยต่อไปให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ด้วยเอนไซม์เอกโซไคติเนสหรือไคโตไบเอส (chitobiase) ขั้นตอนสุดท้ายคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์เอนอะซิทิลกลูโคลซะมินิเดส (*N*-acetyl glucosaminidase)[2]

เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไปเช่น ที่ส่วนต่างของพืช และระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล และสัตว์เคี้ยวเอื้อง หน้าที่ของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีแตกต่างกันไป เช่น เกี่ยวข้องในขบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา[3-5] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเอนไซม์นี้มีส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่[6,7] มีส่วนช่วยในการย่อยสารอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระ ดูกสันหลัง เช่น แมลง และปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาทอง ปลาเทร้า ปลาซีบาส เป็นต้น[8-10] นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) เก่าที่ปกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา[11] ส่วนในพืชเอนไซม์นี้มีส่วนในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช[12,13] และขบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช[14]

ได้มีการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) ในแฟมิลี Vibrionaceae เป็นแหล่งเอนไซม์ไคติเนสที่สำคัญ ในธรรมชาติแบคทีเรียนี้จะผลิตและหลั่งเอนไซม์ออกจากเซลล์เพื่อย่อยสลายไคตินที่สะสมหรือเป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในทะเลเช่น สาหร่ายสีเขียว ไดอะตอม เป็นต้น ให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของเซลล์[15-17] ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแหล่งเอนไซม์ที่สำคัญต่อขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioconversion process) ได้มีการวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาทางโมเลกุลเพื่อศึกษาองค์ประกอบของระบบยีนไคติเนสในแบคทีเรีย[18,19] แต่การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์นี้มีเพียงในเชื้อแบคทีเรียที่สกัดจากดิน *Serratia marcescens*[20] เป้าหมายหลักของงานวิจัยทางด้านโครงสร้างเพื่อเข้าใจกลไกการทำงานการของเอ็นไซม์โดยละเอียดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เช่นการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา[21] การเกษตร เช่น การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่างๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่ว อ้อย เป็นต้นให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านโรคราต่าง ๆ[22] และทางเทคโนโลยีชีวภาพ

เช่น การกำจัดกากของเสียไคตินและนำผลิตผลจากการย่อยไคตินไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และการเกษตร[23,24]

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยระดับปริญญาเอกของผู้วิจัยที่ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสในเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae*[25-26] เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการทดลองขั้นต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้ผลิตเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตเอนไซม์ไคติเนสมากกว่าหนึ่งชนิด ดังนั้น แบคทีเรียนี้จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาระบบยีนและโครงสร้างของเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบกับระบบยีนของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการแยกยีนไคติเนสจาก เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* โดยขอบเขตงานวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นด้วยการเตรียมจีโนมของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ติดตามด้วยการใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาหรือเทคนิคทาง PCR เพื่อคัดหายีนไคติเนสจากจีโนมที่เตรียมได้ ขั้นตอนสุดท้ายคือการโคลนยีนและการวิเคราะห์หาลำดับของยีนโดยเทคนิค DNA sequencing

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เข้าใจระบบของยีนไคติเนสในเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio*
2. เป็นการเตรียมเอนไซม์ที่จะใช้ศึกษาโครงสร้างสามมิติเพื่อความเข้าใจในกลไกการทำงานของเอนไซม์นี้อย่างละเอียด
3. มีแนวทางในการวิจัยในอนาคตที่จะมุ่งไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์นี้ให้เหมาะสมเพื่อนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านการแพทย์ การอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การสกัดจีโนมของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง marine medium, pH 7.6 (ภาคผนวก ก) มาเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 10 ml โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C ในตู้อบทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 100 ml และทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่สภาวะเดิมจนเชื้อเจริญเติบโตถึง stationary phase ทำการปั่นเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดจีโนม[27] ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ละลายเซลล์ด้วย 9.5 ml Tris-EDTA (TE) buffer ที่มี 10%(w/v) SDS และ 0.1 mg/ml proteinase K เป็นองค์ประกอบ เขย่าเบา ๆ แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติม 1.8 ml 5M NaCl เขย่าให้เข้ากัน
3. เติม 1.5 ml สารละลาย cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)/NaCl (ภาคผนวก ก) เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 60°C เป็นเวลา 20 นาที
4. เติม chloroform/isoamyl alcolhol (24:1 โดยปริมาตร) ในปริมาตรที่เท่ากับสายละลายตัวอย่าง กลับหลอดทดลองไปมาเบา ๆ แล้วปั่นแยกชั้น DNA ออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที
5. ค่อย ๆ ดูดสารละลายชั้นบนที่มีจีโนมของแบคทีเรียอยู่ลงในหลอดทดลองใหม่ โดยใช้ micropipette ขนาด 1.0 ml ที่ตัดปลายออก
6. เติม 0.6 volumes isopropranol ลงในสายละลาย DNA กลับหลอดทดลองไปมาเบา ๆ จะสังเกตเห็นตะกอน DNA มีลักษณะเป็นสีขาวเป็นก้อนพันกันอยู่
7. ค่อย ๆ ใช้ Pasteur pipette ที่ปลายงอเป็นตะขอปิด เขี่ยตะกอน DNA ขึ้นมาใส่หลอดทดลองใหม่ที่มี 1 ml 70% (v/v) ethanol
8. ปั่นแยกตะกอน DNA ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลาย ethanol ออก คว่ำหลอดทดลองพอให้ DNA แห้งแบบหมาด ๆ แล้วละลายตะกอน DNA ด้วย 4 ml buffer ทิ้งสารละลาย DNA ค้างคืนไว้ที่ 4°C
9. วัดค่า A_{260}/A_{280} เพื่อหาความบริสุทธิ์และหาความเข้มข้น DNAที่เตรียมได้

2.2. การเตรียมจีโนมของแบคทีเรียขนาด 3-8 kb เพื่อการตรวจหายีนไดติเนส

2.2.1 การเตรียม *Sau*3AI partial digests จาก genomic DNA ของเชื้อ *V. alginolyticus* 283

ทำการย่อย genomic DNA ที่เตรียมได้ข้างต้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau* 3AI (Promega, USA) โดยใช้ปฏิกิริยา 450 µl ที่ประกอบด้วย

10 µg genomic DNA	150 µl
*Sau*3AI buffer	45 µl
BSA	50 µl
dH_2O	205 µl
total volume	450 µl

ทำการย่อย DNA ด้วยปฏิกิริยาเดียวกันซ้ำกัน 4 ครั้งเพื่อให้ปริมาณ partial digests ที่มากพอ ทำการบ่มปฏิกิริยาในแต่ละหลอดที่ 37°C เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นเติม 10 µl 0.5 M EDTA เพื่อหยุดปฏิกิริยา และทำการเตรียม DNA ที่ถูกย่อยดังนี้

1. ตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethanol ละลายตะกอน DNA ด้วย 400 µl dH_2O
2. แยก DNA โดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีส โดยใช้ 0.8 % agarose gel โดยใช้ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 45 นาที
3. ย้อม DNA ด้วย ethidium bromide แล้วตัดเจลช่วงที่มี DNA ขนาด 3-8 kb
4. สกัด DNA จากเจลโดยใช้ DNA purification kit (Qiagen, Germany)
5. ชะ DNA ออกจากเจลด้วย 2 x 60 ml dH_2O
6. ทำการตรวจสอบขนาดของ DNA ที่สกัดได้ว่าถูกต้องหรือไม่ โดย run 2 µl ของ DNA ที่สกัดได้บน 1% agarose gel เทียบกับ DNA มาตรฐานคือ 1 kb ladder marker

2.2.2. การเตรียม pBluescript II KS(-) สำหรับ ligation

ทำการเตรียมพลาสมิด pBluescript II KS(-) โดยใช้ Plasmid Mininprep kit (Qiagen, Germany) และทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ดังนี้

ปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย

pBluescript plasmid	20 µl
10x *Bam*HI buffer	5 µl
*Bam*HI	2.5 µl
dH_2O	22.5 µl

บ่มปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นเวลา 90 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 µl 0.5 M EDTA และให้ความร้อนที่ 70°C นาน 10 นาที

ทำการเตรียมพลาสมิด pBluescript II KS(-) (ภาคผนวก ข) โดยใช้ Plasmid Mininprep kit (Qiagen, Germnay) และทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ดังนี้

ปฏิกิริยา 50 µl ประกอบด้วย

pBluescript plasmid	20 µl
10 x *Bam*HI buffer	5 µl
*Bam*HI	2.5 µl
dH_2O	22.5 µl

บ่มปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นเวลา 90 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 µl 0.5 M EDTA และให้ความร้อนที่ 70°C นาน 10 นาที แล้ว run 1µl ของพลาสมิดที่เตรียมได้บน 1% agarose gel เทียบหาปริมาณ DNA กับ *Sau*3AI partial digest และประมาณสัดส่วนของดีเอ็นเอกับพลาสมิด

2.3 การทำ ligation

ทำการเชื่อมพลาสมิด pBluescript II KS(-) ที่ย่อยด้วย *Bam*HI กับ *Sau*3AI partial digests โดยใช้อัตราส่วนของชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดคือ 5:1และ 10:1 ดังปฏิกิริยาข้างล่าง

ปฏิกิริยา 25 µl ประกอบด้วย

องค์ประกอบ	อัตราส่วนของ *Sau*3AI partial digests: plasmid		
	5:1 (µl)	10:1 (µl)	Control (µl)
*Bam*HI digested pBluescript	2	2	2
*Sau*3AI partial digests	5	10	-
10x ligation buffer	2.5	2.5	2.5
*Bam*HI	1	1	1
DNA ligase	1	1	1
dH_2O	13.5	8.5	18.5

บ่มปฏิกิริยาค้างคืนที่ 16°C หลังจากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย 10 µl dH_2O แล้วนำ DNA เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี electroporation

หลังจากนั้นทำการ spread เซลล์ปริมาณ 50 ml ลงใน LB agar plate ที่มี 100 μg/ml ampicillin และ 40 μg/ml X-Gal บ่มเซลล์ที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการนับโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้น

2.3 การตรวจหายีนไคติเนสโดยวิธี expression screening

ทำตรวจสอบหายีนไคติเนสจาก *Sau3AI* partial digests ที่สร้างขึ้นโดยการทำ colony lift ตามวิธีของ Sedgwick *et. al.*[28] กล่าวคือ ทำการ lift โคโลนีทั้งหมดบน agar plate ด้วย Hyperbond C nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Sweden) ที่ตัดเป็นวงกลมเท่ากับขนาดของ Pestri dish ทำเครื่องหมายบนเมมเบรนเพื่อแสดงตำแหน่งของโคโลนีที่ยกขึ้นมา นำเมมเบรนไปวางบนกระดาษกรองที่ทำให้ชุ่มด้วย 5% (w/v) SDS เพื่อสลายโคโลนีที่อยู่บนเมมเบรน ทำการ fix เซลล์ที่แตกด้วยการอบที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเมมเบรนมา block ด้วย 5% (w/v) skimmed milk ที่เตรียมใน PBS-T buffer (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 30 นาทีและทำการตรวจหาการโปรตีนไคติเนสที่สร้างขึ้นทางอิมมูโนวิทยาด้วยวิธี ECL (Amersham Bioscience, Sweden) โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies [25] ที่มีอยู่ในสัดส่วน 1:2,500 และใช้ anti-IgG polyclonal antibodies ที่ conjugate กับ horse raddish peroxidase ในสัดส่วน 1:5,000 เป็น secondary antibodies และใช้ chemiluminescence ECL เป็นสับสเตรท ส่วน agar plate ตั้งต้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงเพื่อให้โคโลนีโตเหมือนเดิมและเก็บไว้อ้างอิงหาตำแหน่งของโคโลนีที่ให้ผลบวก

2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนไคติเนส

สุ่มเลือกโคโลนีที่ให้ผลบวก 6 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 ml ที่มี 100 μg/ml ampicillin และ 0.5 mM IPTG หรือ 2.5%(w/v) colloidal chitin (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่ 37°C หลังจากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์และสลายเซลล์ด้วยการเติม 100 μl 3xSDS loading buffer ทำการปั่นแยกส่วนของเซลล์ที่ไม่ละลายออกไป นำส่วนใสที่ได้ของแต่ละตัวอย่างปริมาตร 15 μl มาแยกด้วยวิธีอิเลคโตรโฟเรซีสโดยใช้ 12% acrylamide gel โดยทำการแยกโปรตีนในเจล 2 แผ่น เจลแผ่นที่ 1 นำไปย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue ส่วนเจลแผ่นที่2 นำไปทำการตรวจหาโปรตีนโดยวิธี immunoblotting โดยตรวจหาเอนไซม์ไคติเนสด้วย anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies ตามการทดลองที่ได้กล่าวมาแล้ว

2.5 การวิเคราะห์ DNA insert และการทำ partial DNA sequencing

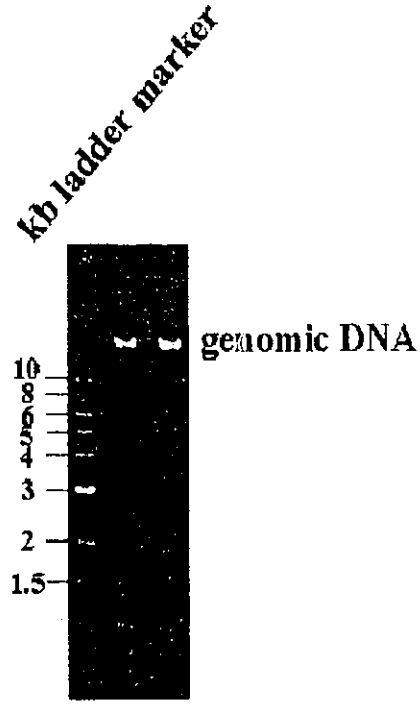
ทำการสกัดริคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากเซลล์ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสโดยใช้ Plasmid Mininprep kit (Qiagen, Germnay) แล้วทำการพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ เช่น *Bam*HI *Eco*RI *Kpn*I *Xba*I *Sac*I *Nco*I *Xho*I *Not*I *Sau*3AI และ *Pst*I และแยก DNA บน 1% agarose gel โดยวิธีอิเลคโตรโฟเรซีส สังเกตขนาดและชิ้นส่วนของดีเอ็นเอและทำการตรวจสอบยีนไคติเนสโดยเทคนิค PCR โดยใช้ forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการ amplify ยีนไคติเนส เอ จากเชื้อ *V. carchariae* [26] ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี automatic sequencing (BSU, Thailand) โดยใช้ universal primers คือ M13 reverse primer และ M13 forward primer เป็น primer ตั้งต้น

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การเตรียม *Sau*3AI partial digests จาก genomic DNA ของเชื้อ *V. alginolyticus* 283

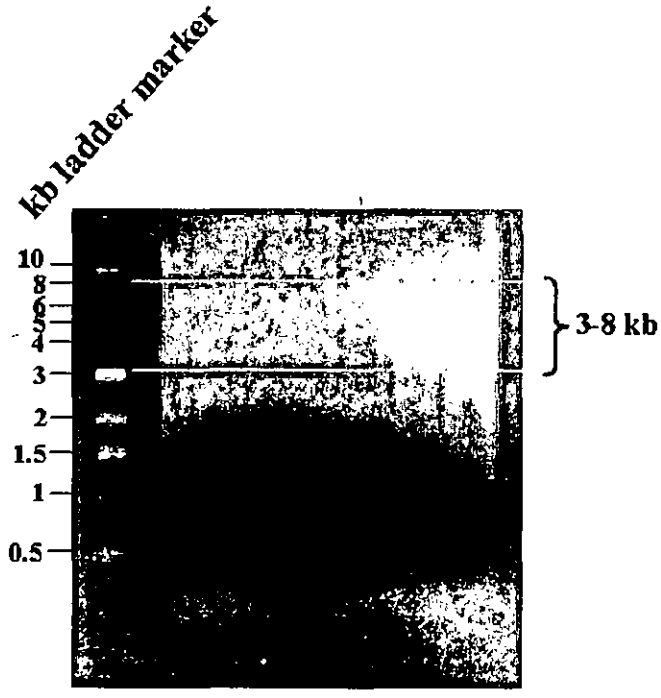
เมื่อทำการเตรียมจีโนมของเชื้อ *V. alginolyticus* 283 โดยวิธีของ Ausubel [27] และได้ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีสโดยใช้ 0.8% agarose gel พบว่าจีโนมที่เตรียมได้ที่ได้มีคุณภาพที่ดี (รูปที่ 2) โดยดีเอ็นได้ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นแถบคมชัดไม่แตกหักเป็นเส้นเล็ก ๆ ในระหว่างการเตรียม ปริมาณของดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อ 100 ml คือ 1.40 mg



รูปที่ 2 แสดงจีโนมที่สกัดจากเชื้อ *V. alginolyticus* 283

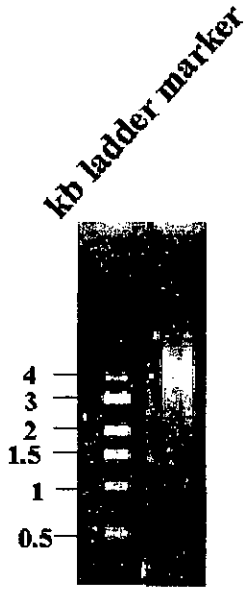
จากจีโนมที่เตรียมได้นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัด *Sau*3AI เอนไซม์นี้มีความสามารถในการตัดแบบจำเพาะที่มี recognition site ที่มีลำดับของนิวคลิโอไทด์ 4 ตัว คือ /GATC ทำให้ตัดชิ้นจีโนมได้ถี่และมีขนาดของ DNA ที่ถูกย่อยจากชิ้นเล็กมาก ๆ ไปถึงชิ้นใหญ่มาก ๆ เมื่อให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 30 mU/µl และ

เวลาในย่อย 120 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C พบว่าขนาดของ DNA ที่ถูกย่อยมีปริมาณมากอยู่ในช่วง 3-8 kb ซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ (รูปที่ 3A)



รูปที่ 3A แสดงขนาดและปริมาณของจีโนมที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI (30 mU/µl) เป็นเวลา 120 นาที ที่ 37°C

ทำการตัดเจลภายใต้แสง UV ในช่วงดีเอ็นเอ ขนาด 3-8 kb แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ Qiagen DNA Extraction kit และทำตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้อีกครั้งหนึ่งโดยวิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีสโดยใช้ 1% agarose gel พบว่าได้ดีเอ็นเอ ตามขนาดที่ต้องการพร้อม (รูปที่ 3B) ที่จะนำไปสร้างเป็น DNA library



รูปที่ 3B แสดงขนาด genomic DNA (3-8 kb) หลังจากถูกย่อยด้วย *Sau*3AI และทำการสกัดด้วย Qiagen DNA Extraction kit

3.2 การตรวจหาโคลนที่มียีนไคติเนสจาก DNA library

Partial digests ของจีโนมที่เตรียมด้วยเอนไซม์ Sau3AI สามารถที่จะนำมาเชื่อมกับพลาสมิด pBluescript II KS(-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองมีตำแหน่งตัดที่ overlap กัน (*Sau3*AI คือ /**GATC** และ*Bam*HI คือ /G**GATC**C) เมื่อทำปฏิกิริยาเชื่อม *Sau*3AI partial digests กับพลาสมิด pBluescript โดยใช้อัตราส่วนของชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิดคือ 5:1 และ 10:1 ดังการทดลองที่ 2.2.3 แล้ว transform ริคอมบิแนนพลาสมิดเข้าไปในแบคทีเรียเจ้าบ้านคือ *E. coli* DH5α จากปริมาตรของเซลล์ทั้งหมด 50 µl ได้ใช้ 10 µl นับจำนวนโคโลนีบน LB/amp agar plate และทำ primary screening เพื่อตรวจหา DNA insert พบว่ามีโคโลนีทั้งหมด 103 โคโลนีบน plate ที่ใช้สัดส่วนของดีเอ็นเอกับพลาสมิดเป็น 5:1 และ 11 โคโลนีบน plate ที่ใช้สัดส่วนของ DNA กับพลาสมิดเป็น 10:1 ส่วนใน control plate ไม่พบว่ามีโคโลนีขึ้นเลย

จากโคโลนีที่ขึ้นบน LB/amp agar plate ได้ทำ colony lift (ดูการทดลองที่ 2.3) ตามด้วย immunoblotting โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A polyclonal antibodies พบว่ามี 1 โคโลนีใน plate ที่มีอัตราส่วนของ DNA กับพลาสมิดเป็น 10:1 ที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดี จึงทำการเขี่ยโคโลนีดังกล่าวมาเลี้ยงใน 10

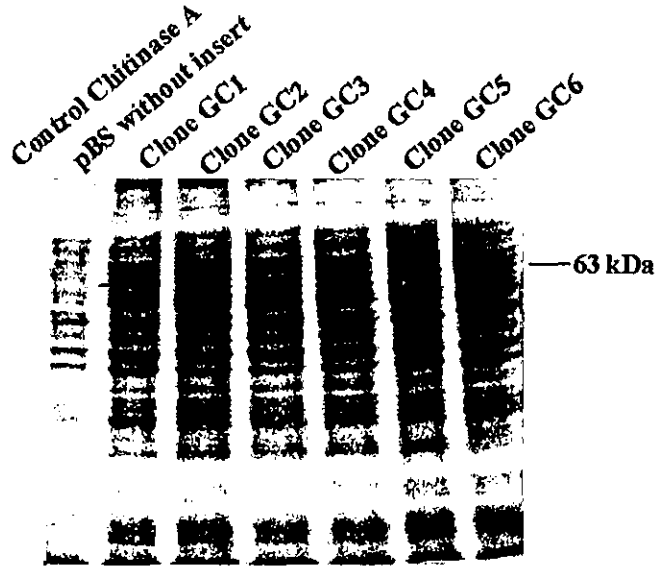
ml อาหารเหลว LB/amp และทำการ spread เชื้อลงบน LB/amp agar plate ที่มี 0.5 mM IPTG ทำการบ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมงแล้วทำ colony lift ครั้งที่ 2 โดยใช้ anti-chitinase A antibodies เพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้งหนึ่งดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 โคโลนีที่ให้ผลบวกกับ anti-chitinase A antibodies หลังจากทำ colony lift ครั้งที่ 2

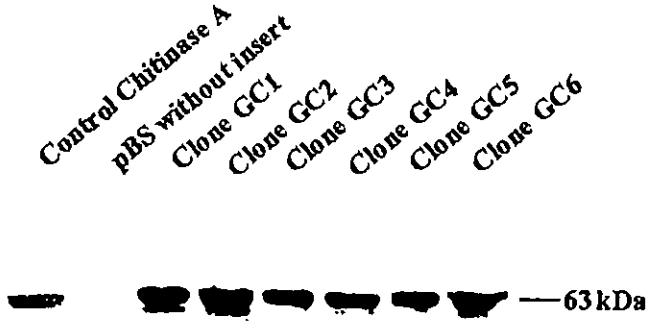
การให้ผลบวกกับแอนติบอดีแสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมียีนไคติเนสที่สามารถแสดงออกและสร้างแอนติเจนที่จับกับ anti-chitinase antibodies ได้คือโปรตีนไคติเนส

3.3 การตรวจสอบเบื้องต้นการแสดงออกของยีนไคติเนส

ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน 6 โคลนคือ GC1-GC6 โดยการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/amp ที่มี 0.5 mM IPTG ทำการบ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 3x SDS loading buffer ไปสลายเซลล์หลังจากนั้นปั่นกำจัดส่วนที่เป็นเศษเซลล์ทิ้งไป นำส่วนใส 15 µl มาวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE โดย เพื่อทำการศึกษาการผลิตโปรตีนไคติเนสในหลอดทดลองที่วิเคราะห์จาก crude protein โดยการย้อมโปรตีนด้วย Coomassie blue (รูปที่ 5A) และการทำ immunoblotting โดยใช้ anti-*V. carchariae* chitinase A antibodies (รูปที่ 5B) พบว่าโคลนทั้ง 6 สามารถผลิตโปรตีนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีโดยขนาดของริคอมบิแนนท์ที่สร้างขึ้นคือ ~63 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของเอนไซม์ไคติเนส เอ ที่สร้างโดยเชื้อ *V. carchariae*



รูปที่ 5A SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน GC1-GC6

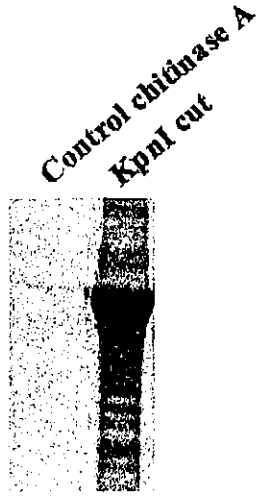


รูปที่ 5B Immunoblotting แสดงการแสดงออกของยีนไคติเนสของโคลน GC1-GC6

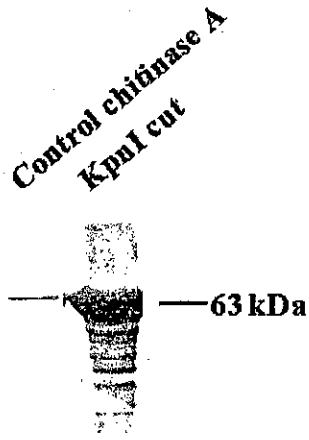
3.4 การวิเคราะห์ DNA insert

จากโคลนทั้ง6 ที่สามารถผลิตโปรตีนไคได้เลือกโคลนที่ 6 มาทำการสกัดพลาสมิดและทำการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ (ดูการวิธีการทดลองที่ 2 .5) ผลการย่อยด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I ทำให้ทราบว่า DNA insert มีขนาด >10 kb และดีเอ็นเอนี้ถูกตัดให้ได้ขนาดย่อยต่างๆ เมื่อใช้เอนไซม์ตัวอื่น และพบว่าเอนไซม์ *Kpn*I สามารถตัดแล้วให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงเป็น 10 kb จึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอขนาด 10 kb ดังกล่าวและทำให้บริสุทธิ์ตามด้วยการ religate ตัวเองและนำไป religated plasmid ไป transform เข้า *E. coli* DH5α และบ่มเซลล์ 16 ชั่วโมงบน LB/amp agar plateพบว่ามีโคโลนีเกิดขึ้นแสดงว่าดีเอ็นเอขนาด 10 kb ที่ตัดด้วย *Kpn*I ประกอบด้วยพลาสมิด pBluescript (3 kb) และชิ้นดีเอ็นของแบคทีเรียอีก 7 kb

ขั้นตอนต่อมาได้ทดสอบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดมีชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสที่แสดงออกได้หรือไม่ จึงได้ทำการเตรียมเซลล์ดังการทดลองที่ 2.4 โดยการเลี้ยงเซลล์ในปริมาตร 10 ml ในอาหารเหลวแล้วสลายเซลล์ด้วย 3x SDS loading buffer ทำการแยก crude protein ด้วยวิธี SDS-PAGE และทำ immunoblotting พบว่าโคลนดังกล่าวสามารถสร้างโปรตีนไคติเนสที่มีขนาด 63 kDa ดังรูปที่ 6A และ 6B

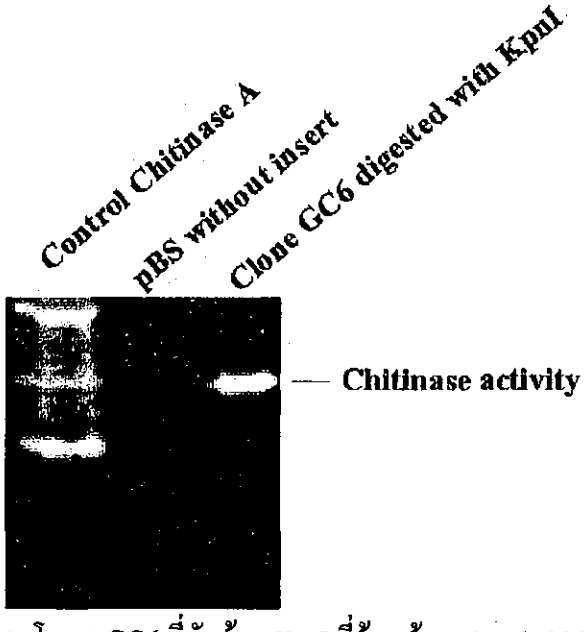


รูปที่ 6A SDS-PAGE แสดงการสร้างโปรตีนไคติเนสโดยโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I



รูปที่ 6B Immunoblotting แสดงการสร้างแอนติเจนไคติเนสโดยโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I ที่จำเพาะต่อ anti-chitinase A antibodies

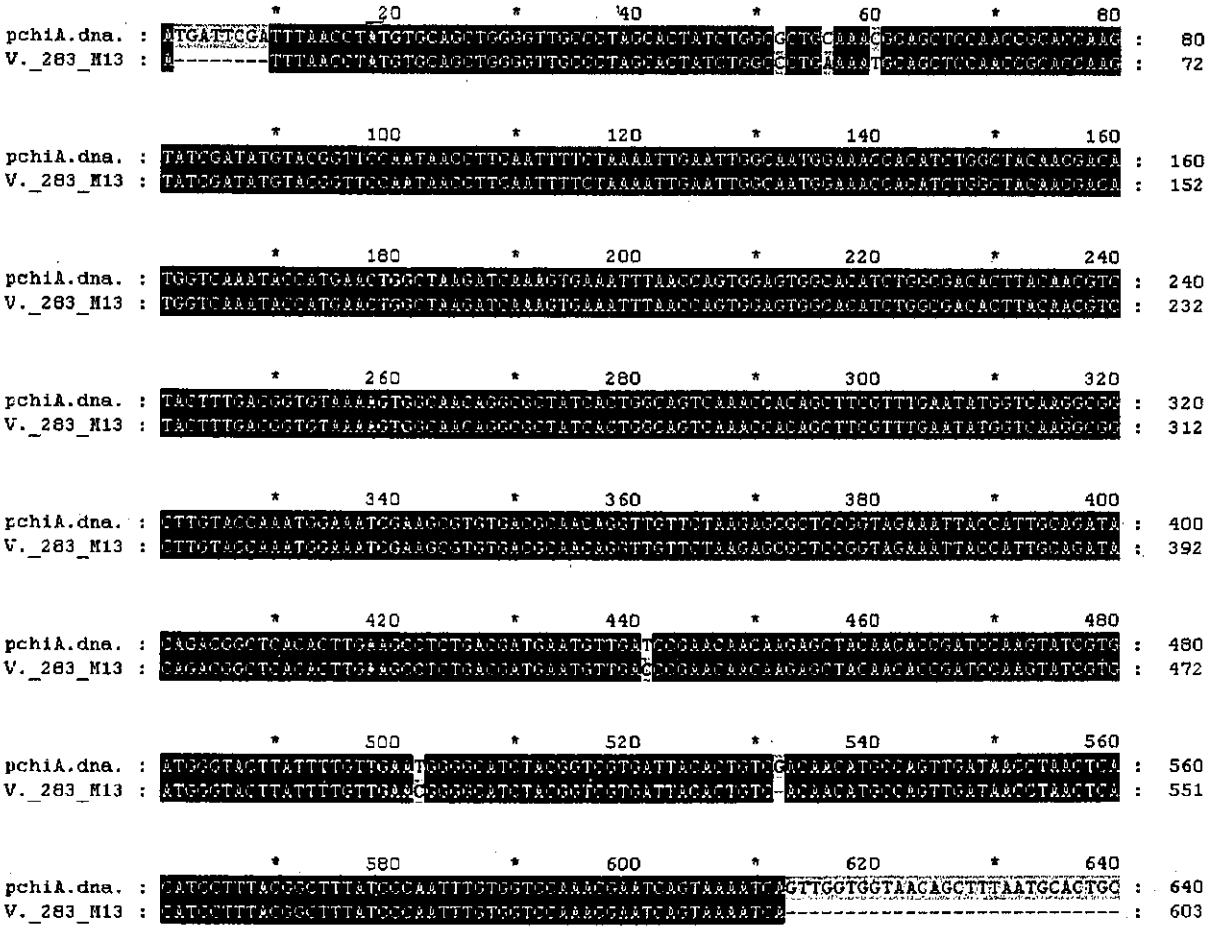
จากผลการทดลองที่ได้จากการย้อมไคติเนสแอคติวิตี้บน native PAGE (รูปที่ 6C) พบว่าโคลนขนาด 7 kb ที่ตัดด้วย *Kpn*I มีความสามารถในการสลาย glycol-chitin ได้ จากการทดลองดังกล่าวแสดงว่าโคลนดังกล่าวมียีนไคติเนสที่แสดงออกได้



รูปที่ 6C Native PAGE ของโคลน GC6 ที่ตัดด้วย *Kpn*I ที่ย้อมด้วย glycol chitin

3.5 การทำ partial DNA sequencing

ได้ทำการสกัดพลาสมิดของโคลน GC6 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 7 kb ที่ย่อยด้วย *Kpn*I และส่งไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ โดยใช้โอลิโกนิวคลิโอไทด์ 2 ตัวคือ M13 forward และ M13 reverse เป็น primer ผลการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่าส่วนของ DNA insert มีลำดับของนิวคลิโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนส เอ ที่สกัดจากเชื้อ *V. carchariae* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน 98.3% (รูปที่ 7) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโคลนที่ได้มียีนไคติเนส อยู่



รูปที่ 7 แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ของโคลน GC6 เทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนส เอ ของเชื้อ *V. carchariae*

บทที่ 4
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดจีโนมของเชื้อแบคทีเรียในทะเล *V. alginolyticus* สายพันธุ์ 283 และได้เตรียม genomic library ของดีเอ็นเอดังกล่าวโดยการตัดดีเอ็นเอให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3*AI และเลือกสกัดเฉพาะ ดีเอ็นเอที่ถูกตัดได้ขนาด 3-8 kb แล้วทำการโคลนชิ้น DNA นี้เข้าไปในพลาสมิด pBluescript II KS(-) และ transform รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าไปใน *E. coli* DH5α จากนั้นได้ทำการตรวจสอบหายีนไคติเนสจากจำนวนโคลนทั้งหมดโดยวิธี immuno screening พบว่ามีโคลนที่ให้ผลบวกกับ anti-*V. carchariae* chitinase polyclonal antibodies หลังจากทำ secondary screening ได้เลือกสุ่มโคลนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีมา 6 โคลนคือ โคลน GC1-GC6 มาทำการศึกษาการแสดงออกของยีนไคติเนส ผลของ SDS-PAGE และ immunoblotting แสดงให้เห็นว่าโคลนทั้งหมดที่เลือกมาศึกษามีชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนไคติเนสเป็นองค์ประกอบ จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลาย ๆ ตัว พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 มีขนาด >10 kbและพบว่าการตัดชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ *Kpn*I ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดเล็กลงเหลือ 7 kb ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE การทำ immunoblotting และการหาแอคติวิตี้โดยใช้ glycol chitin เป็นสับสเตรทแสดงให้เห็นว่า DNA insert มียีนไคติเนสที่สร้างโปรตีนขนาด 63 kDa จากการทำ partial DNA sequencing พบว่าลำดับนิวคลิโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอของโคลน GC6 ที่ย่อยด้วย *Kpn*I มีความเหมือนกับลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนไคติเนส เอ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae* คือ 98.3% [26]

ข้อเสนอแนะ

การทดลองในลำดับต่อไปคือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนไคติเนสที่แยกได้และการศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์และความสามารถในการย่อยไคตินของเอนไซม์ไคติเนสดังกล่าว

บรรณานุกรม

1. Gooday, G.W. (1994) In C. Ratledge (ed.) Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 279-312
2. Davis, B., and Eveleigh, D.E. (1984) In Chitin, Chitosan, and Related enzymes (Zakikas, J.P., ed.) Academic Press, New York. 160-179.
3. Papavizas, C.G. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54
4. Cabib, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 59-101
5. Kuranda, M., and Robbins, P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* 266, 19758-19767
6. Srivastava, A.K., Defago, G., and Boller, T. (1985) Secretion of chitinase by *Aphanocladium album*, a hyperparasite of wheat rust. *Experientia.* 41, 1612-1613
7. Sivan, A., and Chet, I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum. J. Gen. Microbiol.* 135, 675-682
8. Jeuniaux C. (1966) Chitinases. *Methods Enzymol.* 8, 644-650
9. Okutani, K. (1977) Chitin digestion in the digestive tract of fish. *Proc. First Int. Confer. Chitin/Chitosan*, Boston MA (*USA*), April[11th-13th], 1977, 554-562
10. Okutani, K., Sawada, T., and Kimata, M. (1967) Studies of chitinolytic enzymes in aquatic animals -VI. The chitinolytic enzyme present in rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 33, 952-955
11. Spindler-Barth, M. (1993) Hormonal regulation of chitin metabolism in insect cell lines. In Chitin Enzymology (Muzzarelli, R.A.A., ed.), European Chitin Society, *Italy*, 75-82
12. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., and Vogeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157, 22-31
13. Pleban, S., Chernin, L., and Chet, I. (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus. Lett Appl. Microbiol.* 25, 284-288\
14. de Jong, A.J., Cordewener, J., lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerchhove, J., van Kammen, A., de Vries, S.C. (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4, 425-433

15. Yu, C., Lee, A.M., Bassler, B.L., and Roseman, S. (1991) Chitin utilization by marine bacteria. A physical function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 266, 24260-24267

16. Montgomery, M.T., and Kirchman, D.L. (1993) Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Environ. Micriobiol.* 59, 373-379

17. Bassler, B.L., Yu, C., Lee, Y.C., and Roseman, S. (1991) Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii. J. Biol. Chem.* 266, 2476-2486

18. Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzyki K., and Tanaka, H. (1990) Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* 172,4107-4022

19. Svityl, A.L., Chadhain, S.M.N., Moore, J.A., and Kirchman, D.L. (1997) Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 408-413

20. Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., and Vorgias, C.E. (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.8 Å resolution. *Structure* 2, 1169-1180

21. Wang, S.H., Zheng, H.J., Dissanayake, S., Cheng, W.F., Tao, Z.H., Lin, S.Z., Piessens, W.F. (1997) Evaluation of recombinant chitinase and SXP1 antigens as antimicrofilarial vaccines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 474-481

22. Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci, G., and Harman, G.E. (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7860-7865

23. Carroad, P.A., and Tom, R.A. (1978) Bioconversion of shellfish chitin wastes: process conception and selection of microorganisms. *J. Food. Sci.* 43, 1158-1161

24. Cosio, I.G., Fisher, R.A., and Carroad, P.A. (1982) Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *J. Food Sci.* 47, 901-905

25. Suginta, W., Robertson, P.A.W., Austin, B., Fry, S.C., Fothergill-Gilmore, L.A. (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae. J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84

26. Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan,R.R., Svasti, J., and Fothergill-Gilmore, L.A. (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 171-180.

27. Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struh, L.K., 1994. Preparation and analysis of DNA. In Current Protocols in Molecular Biology. (Ausibel, F.M., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struh, L.K., ed.). Sections 2.4.1-2.4.5 (2), John Wiley & Son. Inc., *U.S.A*

28. Sedgwick, S.G., thi Man, N., Ellis, J.M., Crowne, H., and Morris, G.E. (1991) Rapid mapping by transposon mutagenesis of epitopes on the muscular dystrophy protein, dystrophin. *Nucleic Acids Research* 19, 5889-5894

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และสับสเตรท

Marine Medium 2216E

Per litre:

To 950 ml of filtered, aged sea water add:

Bacteriological peptone	5 g
$FePO_4$	0.10 g
bacto-yeast extract	5 g

Shake until solutes have dissolved. Adjust the pH to 7.5-7.6 with 1 N NaOH. Adjust the volume of the solution to 1 litre with filtered, aged sea water. Sterilize by autoclaving for 20 min at 15lb/sq. in. on liquid cycle.

CTAB/NaCl solution

Dissolve 4.1 g of NaCl in 80 ml of distilled-deionized water using a magentic stirrer and stir bar. While stirring, add 10 g CTAB (hexzadecyltrimethylammonium bromide). If needed, dissolve the CTAB by heating the solution to 65°C. Allow the solution to cool to room temperature. Adjust the final volume to 100 ml with distilled-deionized water.

Phosphate-buffered saline plus Tween 20 (PBS-T)

Dissolve 8 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 1.44 g of Na_2HPO_4, and 0.2 g of KH_2PO_4 in 800 ml of distilled H_2O. Adjust the pH to 7.4 with HCl. Add H_2O to 1 litre. Tween 20 (1%) was added and stirred to prior use.

Colloidal chitin

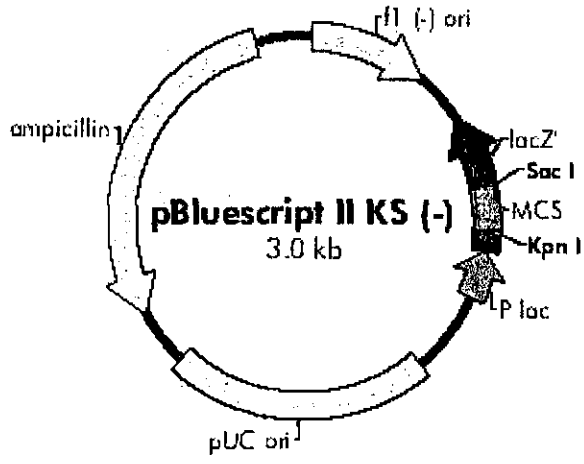
Chitin powder from crab shells (5 g) was added slowly into 60 ml of concentrated HCl and left at 4 °C overnight with vigorous stirring. The mixture was added to 2 litres of ice-cold 95% ethanol with rapid stirring and kept overnight at 25 °C. The precipitant was collected by centrifugation at 5000 ***g*** for 20 min at 4 °C and was washed with sterile distilled water until the colloidal chitin became neutral (pH 7.0). Colloidal chitin was stored at 4 °C until further applications.

Glycol chitin

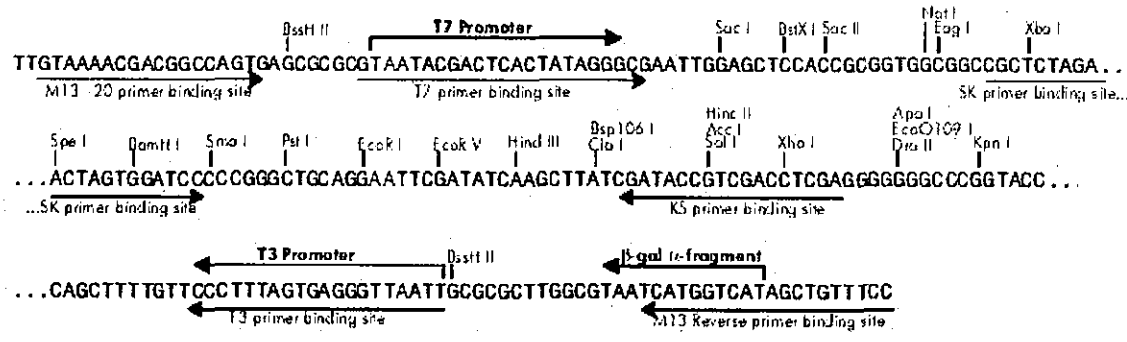
Five grams of glycol chitosan was dissolved in 100 mL of 10% acetic acid by grinding in a mortar, and the viscous solution was allowed to stand overnight at 22°C. Methanol was added, and the solution was vacuum filtrated through a Whatman No. 4 filter paper. The filtrate was transferred into a beaker and 7.5 mL of acetic anhydride was added. The gel was covered with methanol and homogenized. The suspension was centrifuged at 27,000 g for 15 min at 4°C. The gelatinous pellet was resuspended in 1 volume of methanol, homogenized, and centrifuged as in the preceding step. The pellet was resuspended in 500 mL distilled water containing 0.02% (m/v) sodium azide.

ภาคผนวก ข

แผนที่พลาสมิด pBluescript II KS(-)



pBluescript II KS (+/–) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)



ประวัตินักวิจัย

Name Assistant Professor Dr. Wipa Suginta

Affiliation School of Biochemistry, Institute of science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand

Tel: +66 44 22 4313

E-mail wipa@ccs.sut.ac.th

Education

1995-1998 Ph.D. (Biochemistry) Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Edinburgh University, U.K.

1990-1993 M.Sc. (Biochemistry) Dept. of Biochemistry, Mahidol University, Thailand

1986- 1990 B.Sc. (Genetics) Dept. of Botany and Genetics, Chulalongkorn University, Thailand

Experiences

1994-Present **Lecturer in Biochemistry**

School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University, Thailand

1999-2000 **Postdoctoral Research Associate**

Research Title: Cloning, Expression, and Functional Characterisation of Membrane Proteins in the Intracellular Chloride Ion Channel (CLIC) Family.

1995-1998 **Ph.D. Biochemistry**

Thesis Title: Molecular Biological Studies of Chitinase A from the Marine Bacterium, *Vibrio carchariae*

1990-1993 **M.Sc. Biochemistry**

Thesis Title: Purification and Characterisation of β-galactosidase from Thai Jute, *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altisima*

Fellowships/Awards

2004 The General Travel Grant award from the Biochemical Society for a short visit to Germany between March31-May15, 2004.

2003 The DAAD award for a Study Visit to Germany between April1-May15, 2003

1999-2000	Wellcome Trust Fellowship for Postdoctoral research.
1995-1998	Royal Thai Government Scholarship for Ph.D. degree
1994	The Outstanding Poster Presentation Award on the 11th FAOBMB Symposium, 15-18 November, 1994, Bangkok, Thailand
1990-1993	Suranaree University of Technology Scholarship for M.Sc. degree
1989	Most Improving in Study Award for undergraduate study

Meetings/Conferences

1. Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and their function as a non-specific channel, ***Poster Presentation***, the 15th Annual Meeting of the Thai Society for biotechnology, February3-6, 2004. P5.
2. Expression, purification, and preliminarily structural analysis of chitinase A *from Vibrio carchariae*, ***Poster Presentation***, the 15th Annual Meeting of the Thai Society for biotechnology, February3-6, 2004. P164.
3. Molecular actions of Chitinase A in chitin utilization as revealed by HPLC/MS. ***Invited Speaker***, The Joint Senior Research Scholar Meeting: Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22-23, 2003
4. Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, ***Poster Presentation***, The Joint Senior Research Scholar Meeting: Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22-23, 2003
5. Identification of *Burkholderia* porins using MALDI-TOF and nanoelctrospray MS. ***Invited Speaker***, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29-30, 2002.
6. *C*-terminal protein processing study of *Vibrio carchariae* chitinase, using MALDI-TOF and nanoelectrospray MS, ***Poster Presentation***, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29-30, 2002
7. How to prepare your protein for crystallography. ***Invited Speaker***. 1st Southeast Asia Protein Crystallography Workshop, Nakhon Ratchasima, Thailand, May 21-27, 2001.

8. The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins, ***Poster Presentation***, FASEB Summer Research conference on Molecular Biophysics of Cellular Membrane, Vermont, USA. September 2000.
9. Chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*: isolation, nucleotide sequencing, and homology modeling of 3-D structure, ***Poster Presentation***, The 44th Biophysics Meeting, New Orleans, USA. February 21-27, 2000.
10. Attended the Annual Meeting of Scottish Protein Structural Group, Edinburgh, U.K, 1996
11. Attended the Annual Meeting of Scottish Protein Structural Group, Stirling, U.K December 1995.
12 Possible use of glycosidase enzymes from thai plant seeds for oligosaccharide synthesis, **Poster Presentation**, Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function, and applications, The 11th FAOBMB Symposium, Bangkok, Thailand, November 15-18, 1994.
13 β-galactosidase from Thai jute: purification and characterization, **Poster Presentation,** Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function, and applications, The 11th FAOBMB Symposium, Bangkok, Thailand, November 15-18, 1994.

List of Publications

1. **Suginta, W.,** and Svasti, J. (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, pp. 256-260
2. **Suginta, W.**, and Svasti, M.R.J. (1995) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *J. Sci. Soc. Thailand.* 21, 183-186.
3. Surarit, R., Svasti, M.R. J., Srisomsap, C., **Suginta, W.**, Khunyoshyeng, S., Nilwarangkoon, S., Harnsakul, P. and Benjavongkulchai, E. (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok., pp. 251-255.
4. Svasti, J., Srisomsap, C., Surarit, R., Benjavongkulchai, E., **Suginta, W.**, Khunyoshyeng, S., Champattanachai, V., Nilwarangkoon, S., Rungvirayudx, S. (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In *Protein Structure-Function Relationship* (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press pp 249-257.

5. **Suginta, W.**, Robertson, P.A.W., Austin, B., Fry, S.C., Fothergill-Gilmore, L.A. (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84

6. **Suginta W.**, Estibeiro, P., Rigden, D.J., and Fothergill-Gilmore, L.A. (2000) Chitinase A from a marine bacterium. *Vibrio carchariae*, Gene isolation, Nucleotide sequence, and homology modelling of 3D-structure. *Biophy. J.* P417A

7. **Suginta, W.**, and Ashley, R.H. (2000) The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins. *Molecular Biophysics of Cell Membranes (FASEB conference)*, P57.

8. **Suginta, W.**, Karoulias, N., Aitkin, A., and Ashley, R.H. (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. *Biochem. J.* 359, 55-64

9. Sun, Q., McDonald, A., **Suginta, W.**, and Ashley, R.H. (2001) Localisation of a CLIC (Chloride Intracellular Channel) protein fused to green fluorescent protein. *Biochem. Soc. Trans.* A112.

10. Siritapetawee, J., Prinz H., Samosornsuk, W., Ashley R.H., and **Suginta W.** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Biochem. J.* 377, 579-587.

11. **Suginta, W.**, Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, H., Duncan, R.R., Svasti, J., and Fothergill-Gilmore, L.A. (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 171-180.

12. Siritapetawee, J., Prinz, H., Krittanai, C., and **Suginta, W.** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem. J.* In Press.

13. **Suginta, W.**, Svasti J., and Prinz H. Enzymatic properties of a family 18 chitinase, chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC/ESI-MS. (In preparation).

บันทึกข้อความ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สถาบันวิจัยและพัฒนา
รับที่ 1635/47
วันที่ 18 พ.ย. 2547
เวลา 15.30 น.

หน่วยงาน สถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 4198 โทรสาร 4185

ที่ ศธ 5611(14)/๑๖๙ **วันที่** 8 พฤศจิกายน 2547

เรื่อง ส่ง (ร่าง) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

ตามที่ สถาบันวิจัยและพัฒนา ได้แจ้งให้ สถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ทราบเกี่ยวกับผลการพิจารณา (ร่าง) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ที่ผ่านการพิจารณาจากคณะอนุกรรมการพิจารณากลั่นกรองและจัดสรรงบประมาณโครงการวิจัย เรื่อง **การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283** ซึ่งได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 ของ **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์** ตามที่แจ้งแล้วนั้น และขอให้หัวหน้าโครงการส่ง (ร่าง) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ที่ได้ปรับปรุงแล้วมายังสถาบันวิจัยและพัฒนา นั้น

บัดนี้ หัวหน้าโครงการวิจัย ได้ดำเนินการดังกล่าวเป็นที่เรียบร้อยแล้ว สถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ จึงใคร่ขอส่ง (ร่าง) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ **จำนวน 6 ชุด (ดังแนบ)** เพื่อให้สถาบันวิจัยและพัฒนานำเสนอคณะอนุกรรมการพิจารณากลั่นกรองและจัดสรรงบประมาณโครงการวิจัย พิจารณารับรองรายงานต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวณีย์ รัตนพานี)
หัวหน้าสถานวิจัย
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

(ผศ.ดร. สิทธิชัย แสงอาทิตย์)
รก.ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
18 พ.ย. 2547

บันทึกข้อความ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หน่วยงาน ฝ่ายประสานงานการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา โทรศัพท์ 4753 โทรสาร 4750

ที่ ศธ 5621/ ๒๗๑ วันที่ 19 ตุลาคม 2547

เรื่อง ร่างรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ของ อาจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

เรียน หัวหน้าสถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ตามที่ อาจารย์ ดร. วิภา สุจินต์ ได้ส่งร่างรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง " การแยกยีนไคติเนส จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 " ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 (ประเภททุนสนับสนุนการสร้างและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่) ให้สถาบันวิจัยและพัฒนาพิจารณานั้น

สถาบันวิจัยและพัฒนาพิจารณาในเบื้องต้นแล้วเห็นว่าการจัดทำรายงานดังกล่าวมีหัวข้อครบถ้วนตามที่กำหนดไว้ *ยกเว้นชื่อโครงการวิจัยซึ่งไม่ตรงกับที่ระบุในสัญญารับเงินอุดหนุนการวิจัย* (หากต้องการปรับชื่อโครงการตามร่างรายงานที่เสนอมาให้ทำบันทึกแจ้งด้วย) และมีข้อผิดพลาดในการพิมพ์ซึ่งได้ระบุไว้ในร่างรายงานฯ ที่แนบมา

ในการนี้จึงขอความร่วมมือในการแจ้งให้หัวหน้าโครงการวิจัยจัดส่งร่างรายงานการวิจัยที่ปรับปรุงแล้ว จำนวน **6 ชุด** ให้สถาบัน ฯ ภายในวันที่ **29 ตุลาคม 2547** เพื่อนำเสนอคณะอนุกรรมการพิจารณากลั่นกรองและจัดสรรงบประมาณโครงการวิจัย พิจารณารับรองรายงานต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา พร้อมนี้ได้ส่งคืนร่างรายงานการวิจัย มาด้วยแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธิชัย แสงอาทิตย์)
รักษาการแทนผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

สถาบันวิจัยและพัฒนา
รับที่ 9439/47
วันที่ 18 ต.ค. 2547
เวลา 15.30 น.

บันทึกข้อความ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หน่วยงาน สถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ โทร. 4198 โทรสาร 4185

ที่ ศธ 5611(14)/๑๒๐ วันที่ ๑๘ ตุลาคม 2547

เรื่อง ส่ง (ร่าง) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

---

(1) เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

สถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ใคร่ขอส่ง (ร่าง) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง **การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283** ของ **ดร. วิภา สุจินต์** ซึ่งได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ประเภทเงินอุดหนุนการวิจัยเพื่อสนับสนุนการสร้างและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 จำนวน 1 ชุด (ดังแนบ) เพื่อให้สถาบันวิจัยและพัฒนาพิจารณาดำเนินการต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวณีย์ รัตนพานี)
หัวหน้าสถานวิจัย
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

(2) เรียน ดร.วิภา
เพื่อโปรดดำเนินการต่อไป

(ผศ. ดร. สิทธิชัย แสงอาทิตย์)
รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
18 ต.ค. 2547

(3) ทราบ
ดร.
๑๙ ต.ค. 47

แบบ สบวพ. -1-01
FORM IRD-B-01

บันทึกข้อความ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สถาบันวิจัยและพัฒนา
รับที่ 385/45
วันที่ 11 ส.ค. 2545
เวลา 15.30 น.

หน่วยงาน สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ โทร 4167
School /Institute Tel/Fax.

ที่ ทม ๗๑๑๑(๑๑)/๑๕ วันที่ 28 กรกฎาคม 2545

เรื่อง ขออนุมัติเบิกเงินอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 งวดที่ -
Subject : Request the payment of research allocation for fiscal year Installment no.

เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
To : Director of Institute of research and development

ตามที่ข้าพเจ้า [illegible] สังกัด สำนักวิชา
As I, a member of Institute of

วิทยาศาสตร์ ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัย ประจำปี
was allocated university research funding for fiscal

งบประมาณ พ.ศ. 2544 เพื่อใช้จ่ายในโครงการวิจัยเรื่อง [illegible]
year for the expenditures of project (name)

V. alginolyticus 283

เป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น 50,000.- บาท นั้น
for the amount of baht,

ข้าพเจ้าขออนุมัติเบิกเงินอุดหนุนการวิจัยเพื่อดำเนินงานวิจัยโครงการ ดังกล่าว ประจำงวดที่ 2
I request the payment of research allocation monies for the Installment no.

เป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น 25,000.- บาท (สองหมื่นห้าพันบาทถ้วน)
for the amount of baht

) ตามประมาณการรายจ่าย ดังนี้
as the following expense estimates:

1. ค่าจ้างชั่วคราว ประกอบด้วย
Temporary Wages Consisting of :

ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยคุณวุฒิ - อัตราเดือนละ บาท
Research assistant Wages (degree) amount per month.

ระยะเวลา เดือน จำนวน คน เป็นเงิน บาท
for duration of months No. of employees total amount per month

ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยคุณวุฒิ - อัตราเดือนละ บาท
Research assistant Wages (degree) amount per month.

ระยะเวลา เดือน จำนวน คน เป็นเงิน บาท
for duration of months No. of employees total amount per month

ค่าจ้างคนงานรายเดือน อัตราเดือนละ - บาท
Monthly employee at per month

ระยะเวลา เดือน จำนวน คน เป็นเงิน บาท
for duration of months No. of employees total amount baht

ค่าจ้างคนงานรายวัน อัตราวันละ - บาท
Daily employee at... per day

ระยะเวลา วัน จำนวน คน เป็นเงิน บาท
for duration of days No. of employees total amount baht

รวม บาท
Totaling baht

(2) **เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา**

☐ คณะทำงานฯ ได้รับรองรายงานความก้าวหน้าและรายงานการใช้จ่ายเงินฯ งวดที่ 1 /2544 แล้ว เมื่อ ๒๘ ก.พ. ๔๕

☐ เพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติค่าใช้จ่ายงวดที่ 2 /2544 ในวงเงิน 25,000.- บาท (สองหมื่นห้าพันบาทถ้วน)

☐ ไม่ถูกต้องเนื่องจาก.....

.....

.....

(นางสาวณัฐณิชา มหัทธนาภิวัฒน์)
เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป
สถาบันวิจัยและพัฒนา
25 / ส.ค. / 2545

(3)

☐ **อนุมัติ**ให้เบิกเงินอุดหนุนการวิจัยตามรายการและเงื่อนไขข้างต้นได้

☐ **โปรดแก้ไขตามข้อ (2) และ**.....

.....

.....

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
26 มี.ค. 2545

(4.1) ☐ **เรียน หัวหน้าส่วนการเงินและบัญชี**

เพื่อโปรดดำเนินการโอนเงินอุดหนุนการวิจัย จำนวน 25,000.- บาท (สองหมื่นห้าพันบาทถ้วน .....) เข้าบัญชีเงินฝากกองทรัพย์ธนาคารไทยพาณิชย์สาขาย่อย มหาฯ ชื่อบัญชี มหาวิทยาลัย VIBRIO ALGINOLYTICUS เลขที่บัญชี 707-2-12544-3 ด้วย จักขอบคุณยิ่ง

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
26 มี.ค. 2545

(4.2) ☐ **เรียน หัวหน้าโครงการวิจัย**

สบวพ. ขอส่งสำเนาบันทึกขออนุมัติเงินอุดหนุนการวิจัยเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน สำหรับบันทึกขออนุมัติฉบับจริง ได้ส่งให้ส่วนการเงินและบัญชีเก็บไว้เป็นหลักฐานเพื่อใช้ในการดำเนินการโอนเงินเข้าบัญชีโครงการวิจัยแล้ว

เพื่อโปรดทราบและดำเนินการต่อไป

.....
(นางสาวณัฐณิชา มหัทธนาภิวัฒน์)
เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป
สถาบันวิจัยและพัฒนา
26 / มี.ค. 2545 /

2. ค่าตอบแทนใช้สอย และวัสดุ ประกอบด้วย
Compensation, service contracting and nonrenewable materials expenses

- ค่าอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	เป็นเงิน total amount	5,000.-	บาท baht
- ค่าสารเคมีสำหรับการสกัด โมโรม และสร้าง genomic DNA library	เป็นเงิน total amount	10,000.-	บาท baht
- ค่าอื่นๆ	เป็นเงิน total amount	10,000.-	บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	รวม Totaling	25,000.-	บาท baht

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ
Your approval is hereby requested.

(ดร. วิรัช สุขนาค)
หัวหน้าโครงการวิจัย
Head of project

(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลีย์ รัตนพานี)
หัวหน้าสถานวิจัย
Head of research Department
5 / 03 / 45

(รศ. ดร. ประสาท สืบค้า)
คณบดี
Dean
6 / มี.ค. / 45

แบบ สบวพ-ง-02
Form IRD-B-02

รายงานแสดงการใช้จ่ายเงินอุดหนุนการวิจัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
Research Expenditure Report

1. โครงการวิจัยเรื่อง โปรตีนเอนไซม์จากเชื้อแยกที่ใช้ในทะเล Vibrio alginolyticus 283
Name of Project

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.วิวัฒ สุจินต์ สำนักวิชา วิทยาศาสตร์
Name of head of Project Institute of

3. ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 ทั้งสิ้น
Received University Research Fund for Fiscal Year for the amount of

50,000.- บาท โดยได้รับเงินจากมหาวิทยาลัยครั้งล่าสุดและใช้จ่ายไปแล้ว ดังนี้
baht with the most recent payment from the university and actual expense as follows:

☑ งวดที่ 1 ได้รับเงิน 25,000.- บาท ใช้จ่ายจริงไปทั้งสิ้น 30,457.55 บาท
Installment No. Total amount received baht Total amount spent baht

☐ ค่าครุภัณฑ์ ได้รับเงิน - บาท ใช้จ่ายจริงไปทั้งสิ้น - บาท
Equipment (expense) allocation baht Total amount spent baht

ดังรายละเอียดต่อไปนี้
as follows :

รายการค่าใช้จ่าย Expenditures	งบประมาณ (บาท) Budget (baht) ได้รับจัดสรรตลอดปี Allocation for the whole year	เบิกจ่ายแล้วในงวดก่อน Previous Installment activated	เบิกจ่ายในงวดนี้ Installment to be activated this time	คงเหลือเบิกจ่ายครั้งต่อไป Remaining funds to be activated	หมายเหตุ Notes
ค่าจ้างชั่วคราว ประกอบด้วย (โปรดแสดงรายละเอียด) Temporary Wages (Show details)	-		-	-	
รวม Total	-		-	-	
ค่าตอบแทน ใช้สอย และวัสดุ ประกอบด้วย (โปรดแสดงรายละเอียด) Compensation, Service Contracting and nonrenewable materials expenses (Show details)					
1. Microtips ขนาด 200µl, 1,000µl			1,815.-		
2. Microtubes 1.5 ml	20,000.-		2,400.-	14,925.-	
3. Microtubes 0.5 ml			800.-		
4. Sau3AI	20,000.-		11,000.-	9,000.-	
5. Developer & Fixer	5,000.-		4,360.-	640.-	
6. Phenol : chloroform isoamyl alcohol	5,000.-		3,960.-		
7. others			4080.-	-3,040.-	
VAT (7%) รวม Total	50,000.-		1,992.55 30,457.55	-1,992.55 19,532.45	
ค่าครุภัณฑ์ ประกอบด้วย (โปรดแสดงรายละเอียด) Equipment expenses (show details)					
รวม Total					
รวมค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น Grand total	50,000.-		30,457.55	19,532.45	

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าข้อความดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ
I certify that the above is true in all respects.

(ลงชื่อ) วิวัฒ สุจินต์
(Signed)
หัวหน้าโครงการ
Head of Project
1 / 03 / 2545

แก้ไข
15 มี.ค. 45

แบบรายงานความก้าวหน้าของการวิจัย
Research Progress Report

เพื่อประกอบการพิจารณาขออนุมัติเงินงวดที่ 2./2545
for the consideration of the payment of Installment no.

ตามที่ข้าพเจ้า ดร. วิภา สุจินต์ สังกัดสำนักวิชา วิทยาศาสตร์

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยประจำปีงบประมาณ 2544 เป็นเงิน 50,000.- บาท

เพื่อใช้จ่ายในการทำวิจัยเรื่อง การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล Vibrio alginolyticus 283

ข้าพเจ้าได้เบิกจ่ายเงินงวดที่แล้วเป็นเงิน 25,000.- บาท เมื่อวันที่ 29 เดือน มีนาคม พ.ศ 2544

และได้ทำวิจัยไปแล้วส่วนหนึ่งคิดเป็นร้อยละ 15% ของงานวิจัยทั้งหมด ข้าพเจ้ามีความประสงค์จะเบิกเงินที่เหลือเป็นเงิน 25,000.- บาท จึงขอรายงานความก้าวหน้าที่ได้ทำไปแล้ว ดังนี้

1. **การดำเนินงาน**

☒ 1.1 การวิจัยเป็นไปตามแผนงานที่วางไว้ทุกประการ กล่าวคือ

- ได้ทำการรวบรวมอ้างอิงที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
- ได้ทำการขอเชื้อแบคทีเรีย V. alginolyticus สายพันธ์ 283 ที่ต้องการจากภาควิชา Biological Sciences มหาวิทยาลัย Herriot Watt , Edinburgh
- ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและทำการสกัดโครโมโซมของเชื้อแบคทีเรียเพื่อการเตรียม genomic DNA library ต่อไป

☐ 1.2 มีการเปลี่ยนแปลงแผนงานที่วางไว้ ดังนี้

การดำเนินการล่าช้ากว่าที่คาดการเอาไว้แต่ไม่มีการเปลี่ยนแผนการทำงาน

2. **ปัญหา อุปสรรค และแนวทางแก้ไข**

☐ 2.1 ไม่มีปัญหาและอุปสรรคใด ๆ

☒ 2.2 ข้าพเจ้าประสบปัญหาและอุปสรรคในการทำวิจัย ดังนี้

ปัญหาและอุปสรรคคือ

1. ความล่าช้าของการสั่งซื้อสารเคมีเนื่องจากสารเคมีที่สั่งซื้อบางรายการต้องรอนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น enzyme Sau3AI
2. เงินที่เบิกจ่ายงวดแรกไม่เพียงพอต่อการสั่งซื้อที่จำเป็นในการเริ่มต้นงานวิจัยทำให้เริ่มต้นงานวิจัยไม่ได้ เนื่องสารเคมีทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลมีราคาแพงมาก ๆ
3. ความไม่พร้อมเกี่ยวกับห้องปฏิบัติการและไม่ได้รับความช่วยเหลือจากพนักงานของสาขาที่ดูแลห้องปฏิบัติการและเครื่องมือเท่าที่ควร เช่นการไม่สามารถยืมสารเคมีที่มีอยู่แล้วได้

3. **ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่น ๆ**

เนื่องจากเงินทุนวิจัยที่ได้รับเพียง 50,000.- บาท ถือน้อยมากในการทำงานวิจัยทางชีวเคมีระดับโมเลกุล ดิฉันขอเสนอแนะว่าควรจะให้ผู้รับทุนเบิกจ่ายเงินได้ภายในงวดเดียวเพื่อจะช่วยให้อาจารย์ผู้ทำวิจัยสามารถเตรียมการในช่วงเริ่มต้นงานวิจัยได้ดีขึ้น

พร้อมนี้ข้าพเจ้าได้แนบแบบ สบวพ-ง-02 เพื่อแสดงรายการใช้จ่ายเงินที่ได้เบิกจ่ายไปแล้ว และที่กำลังจะขอเบิกเพื่อประกอบในการพิจารณา

ลงชื่อ.....วิภา สุจินต์.....หัวหน้าโครงการ
(.....ดร. วิภา สุจินต์.....)
วันที่ .....1 มี.ค. 2545.....

หัวข้อรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย
เพื่อประกอบการพิจารณาอนุมัติเงินงวดที่ 2/2545

ผลการดำเนินงานระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2544 ถึงวันที่ 18 มีนาคม 2545

1. ชื่อโครงการ การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธ์ 283

2. หัวหน้าโครงการ ดร.วิภา สุจินต์

3. หน่วยงาน สาขาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

4. วัตถุประสงค์ของโครงการ

    1. การแยกยีนไคติเนส จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* 283
    2. การโคลนยีนไคติเนส ในแบคทีเรีย *E. coli* โดยมีเป้าหมายในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ไคติเนสในอนาคต

5. แผนการดำเนินงานตลอดทั้งโครงการ

กิจกรรม	ปีงบประมาณ พ.ศ. 2544										
	มีค.	เมย.	พค.	มิย.	กค.	สค.	กย.	ตค.	พย.	ธค.	มค.	กพ.
1. ค้นหาข้อมูล	↔											
2. สกัดโครโมโซมของเชื้อ *Vibrio alginolyticus*		⟷										
3. การสร้าง DNA library				⟷								
4. การคัดแยกยีนไคติเนส จาก DNA library						⟷						
5. การโคลนยีนไคติเนสเข้าไปในเชื้อ *E. coli*									⟷			
6. การสรุปผลการทดลอง										↔		
7. การจัดเตรียมเอกสารสรุป											↔	

6. แผนการดำเนินงานหรือกิจกรรมที่วางแผนว่าจะทำในช่วงนี้ที่รายงานนี้

    การสรุปผลการทดลองและการทำเอกสารสรุปเพื่อส่งรายงาน

7. ผลการดำเนินงานวิจัยที่ทำได้จริง

กิจกรรม	ปีงบประมาณ พ.ศ. 2544						
	ตค.	พย.	ธค.	มค.	กพ.	มีค.	เม.ย.
8. ค้นหาข้อมูล	↔						
9. สกัดโครโมโซมของเชื้อ *Vibrio alginolyticus*			⟷				
10. การสร้าง DNA library					⟷		

8. ความก้าวหน้าตั้งแต่เริ่มโครงการวิจัยจนถึงปัจจุบันคิดเป็นร้อยละ 30 %

9. การถ่ายทอดเทคโนโลยี การเผยแพร่ผลงานวิจัย การจดสิทธิบัตร ผลตอบแทนทางธุรกิจ เป็นต้น

อยู่ในระหว่างการดำเนินงานวิจัย แต่ได้ถ่ายเทคนิคทางด้านยีนโคลนนิ่งให้กับนักวิจัยซึ่งตั้งใจว่ากำลังศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษาของสาขาชีวเคมีต่อไป

10. ปัญหา อุปสรรค และแนวทางแก้ไข

    1. ความล่าช้าในการสั่งซื้อสาร,เคมีและวัสดุทำจำเป็น เนื่องจากสารเคมีบางรายการ เช่น Restriction enzyme Sau3A ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และ Nitrocellulose membrane ที่สั่งซื้อไปเลิกผลิต จึงต้องการสั่งซื้อใหม่ซึ่งต้องใช้เวลานานถึง 6 เดือน ในการสั่งซื้อผลิตภัณฑ์ดังกล่าว
    2. เงินเบิกจ่ายงวดแรกจำนวนเงิน 25,000.- บาทไม่เพียงพอเลยสำหรับเริ่มต้นงานวิจัยทำให้มีอุปสรรคต่อการทำวิจัยในช่วงเริ่มต้นมาก และการยืมสารเคมีในห้องปฏิบัติการวิจัย

11. แผนการดำเนินงานขั้นต่อไป

    สร้าง genomic library ของ *Vibrio alginolyticus* 283 และทำการ screen หา *Chi A* gene จาก library ดังกล่าวโดยวิธี immunological approach โดยใช้ anti *V. carchariae* chiA polyclonal antibody เป็นตัวตรวจสอบ

12. ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่น ๆ

    เนื่องจากเงินทุนวิจัยที่ได้รับ 50,000.- บาทเป็นจำนวนเงินน้อยมากในการทำงานวิจัยทางชีวเคมี ดิฉันขอเสนอแนะว่าควรจะให้ผู้รับทุนสามารถเบิกจ่ายเงินได้ภายในงวดเดียวเพื่อจะช่วยให้อาจารย์ผู้ทำวิจัยสามารถเตรียมการในช่วงเริ่มต้นได้ดีมากขึ้น

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ
(ผ.ศ. ดร. สุจินต)
วันที่ 19.03.2003

แบบ สบวพ. -๑-๐๑
FORM RD-๑-๐๑

สถาบันวิจัยและพัฒนา
รับที่ 397/44
วันที่ ๒๘ มิ.ย. 2544
เวลา 14.30 น.

บันทึกข้อความ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หน่วยงาน สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ โทร. ๒๒๕๖
School /Institute Tel/Fax.

ที่ ทม ๗๑๑(๑๖)/๒๒๑ วันที่ ๒๙ มิถุนายน ๒๕๔๔

เรื่อง ขออนุมัติเบิกเงินอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๔๔ งวดที่
Subject : Request the payment of research allocation for fiscal year Installment no.

เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
To : Director of Institute of research and development

ตามที่ข้าพเจ้า ดร. วิภา สุจินต์ สังกัด สำนักวิชา
As I, a member of Institute of

วิทยาศาสตร์ ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัย ประจำปี
was allocated university research funding for fiscal

งบประมาณ พ.ศ. ๒๕๔๔ เพื่อใช้จ่ายในโครงการวิจัยเรื่อง การแยกฟีนโนติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย
year for the expenditures of project (name)

ในกลุ่ม Vibrio alginolyticus สายพันธุ์ ๒๔๖

เป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น ๕๐,๐๐๐ บาท นั้น
for the amount of baht,

ข้าพเจ้าขออนุมัติเบิกเงินอุดหนุนการวิจัยเพื่อดำเนินงานวิจัยโครงการดังกล่าว ประจำงวดที่ ๑
I request the payment of research allocation monies for the Installment no.

เป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น ๒๕,๐๐๐ บาท (สองหมื่นห้าพันบาทถ้วน
for the amount of baht

) ตามประมาณการรายจ่าย ดังนี้
as the following expense estimates:

1. ค่าจ้างชั่วคราว ประกอบด้วย
Temporary Wages Consisting of :

ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยคุณวุฒิ.....อัตราเดือนละ.....บาท
Research assistant Wages (degree) amount per month.

ระยะเวลา.....เดือน จำนวน.....คน เป็นเงิน.....บาท
for duration of months No. of employees total amount per month

ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยคุณวุฒิ.....อัตราเดือนละ.....บาท
Research assistant Wages (degree) amount per month.

ระยะเวลา.....เดือน จำนวน.....คน เป็นเงิน.....บาท
for duration of months No. of employees total amount per month

ค่าจ้างคนงานรายเดือน อัตราเดือนละ.....บาท
Monthly employee at per month

ระยะเวลา.....เดือน จำนวน.....คน เป็นเงิน.....บาท
for duration of months No. of employees total amount baht

ค่าจ้างคนงานรายวัน อัตราวันละ.....บาท
Daily employee at... per day

ระยะเวลา.....วัน จำนวน.....คน เป็นเงิน.....บาท
for duration of days No. of employees total amount baht

รวม.....บาท
Totaling baht

2 ค่าตอบแทนใช้สอย และวัสดุ ประกอบด้วย
Compensation, service contracting and nonrenewable materials expenses

1. ค่าสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์	เป็นเงิน total amount	9,000	บาท baht
2. ค่าสารเคมีสำหรับเตรียม genomic DNA	เป็นเงิน total amount	5,000	บาท baht
3. ค่าสารเคมีสำหรับสร้าง DNA library	เป็นเงิน total amount	5,000	บาท baht.
4. ค่าเอนไซม์	เป็นเงิน total amount	10,000	บาท baht.
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
	เป็นเงิน total amount		บาท baht
รวม Totaling		29,000	บาท baht

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ
Your approval is hereby requested.

(อ.ดร.อิสริยา สุจินต์)
หัวหน้าโครงการวิจัย
Head of project

(รศ.ดร.เสาวณีย์ รัตนพานี)
หัวหน้าสถานวิจัย
Head of research Department
29 / มี.ค. / 2544

(รศ.ดร.กฤษณะ ตาคริก)
รักษาการแทนคณบดีสำนักวิชาวิทยาศาสตร์
29 / มี.ค. / 2544

(2) เรียน ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

☐ คณะทำงานฯ ได้รับรองรายงานความก้าวหน้าและรายงานการใช้จ่ายเงินฯ งวดที่ ../..... แล้ว

☑ เพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติค่าใช้จ่ายงวดที่ 1 / 2544 ในวงเงิน 25,000.- บาท (สองหมื่นห้าพันบาทถ้วน)

☐ ไม่ถูกต้องเนื่องจาก.....

.....

(นางสาวณัฐณิชา มหัทธนาภิวัฒน์)
เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป
สถาบันวิจัยและพัฒนา
3 / มี.ค. / 2544

(3)

☐ อนุมัติให้เบิกเงินอุดหนุนการวิจัยตามรายการและเงื่อนไขข้างต้นได้

☐ โปรดแก้ไขตามข้อ (2) และ.....

.....

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
3/ มี.ค. 2544

(4.1) ☐ เรียน หัวหน้าส่วนการเงินและบัญชี

เพื่อโปรดดำเนินการโอนเงินอุดหนุนการวิจัย จำนวน 25,000.- บาท (สองหมื่นห้าพันบาทถ้วน) เข้าบัญชีเงินฝากออมทรัพย์ธนาคารไทยพาณิชย์สาขาย่อย มทส. ชื่อบัญชี มทส. โครงการ VIBRIO ALGINOLYTICUS เลขที่บัญชี 707-2-12544-5 ด้วย จักขอบคุณยิ่ง

(ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
3/ มี.ค. 2544

(4.2) ☐ เรียน หัวหน้าโครงการวิจัย

สบวพ. ขอส่งสำเนาบันทึกขออนุมัติเงินอุดหนุนการวิจัยเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน สำหรับบันทึกขออนุมัติฉบับจริง ได้ส่งให้ส่วนการเงินและบัญชีเก็บไว้เป็นหลักฐานเพื่อใช้ในการดำเนินการโอนเงินเข้าบัญชีโครงการวิจัยแล้ว

เพื่อโปรดทราบและดำเนินการต่อไป

(นางสาวณัฐณิชา มหัทธนาภิวัฒน์)
เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป
สถาบันวิจัยและพัฒนา
3/ มี.ค. 2544

สัญญาเลขที่ 46 / 2544

ต้นฉบับ

สัญญารับเงินอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สัญญาฉบับนี้ทำขึ้น ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เมื่อวันที่ 29 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2544 ระหว่าง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดย ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา ซึ่งได้รับมอบอำนาจจากอธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีตามคำสั่งมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ 1 / 2542 ลงวันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2542 และ ที่ 633 /2540 ลงวันที่ 10 ตุลาคม 2540 ซึ่งต่อไปในสัญญานี้เรียกว่า ***"ผู้ให้ทุน"*** ฝ่ายหนึ่ง กับ อาจารย์ ดร. วิภา สุจินต์ สังกัดสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งต่อไปในสัญญานี้เรียกว่า ***"ผู้รับทุน"*** อีกฝ่ายหนึ่ง

คู่สัญญาได้ตกลงกันมีข้อความดังต่อไปนี้

ข้อ 1. ***ผู้ให้ทุน***ตกลงให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัย เรื่อง "การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283" ตามเอกสารหมายเลข 3 ตั้งแต่วันที่ 29 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2544 ถึงวันที่ 28 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2545 เป็นจำนวนเงิน 50,000 บาท (ห้าหมื่นบาทถ้วน) โดย***ผู้ให้ทุน***จะจ่ายให้แก่***ผู้รับทุน***เป็นงวดตาม รายละเอียดดังนี้

งวดที่ 1 จ่ายให้เป็นเงินไม่เกินร้อยละ 50 ของเงินอุดหนุนการวิจัยทั้งโครงการ ทั้งนี้ จ่ายให้เป็นเงิน 25,000 บาท (สองหมื่นห้าพันบาทถ้วน) ภายใน 2 สัปดาห์ นับแต่วันลงนามในสัญญา

งวดที่ 2 จ่ายส่วนที่เหลือของเงินอุดหนุนการวิจัยทั้งโครงการ ทั้งนี้ จ่ายให้เป็นเงิน 25,000 บาท (สองหมื่นห้าพันบาทถ้วน) ภายหลังจากที่***ผู้รับทุน***ส่งรายงานความก้าวหน้าของโครงการพร้อมรายงานการเงินงวดที่ 1 โดยรายงานดังกล่าวผ่านการพิจารณาและได้รับการรับรองจากคณะกรรมการประจำสถาบันวิจัยและพัฒนาเรียบร้อยแล้ว

ข้อ 2. เอกสารอันเป็นส่วนหนึ่งของสัญญา ได้แก่

(1) คำสั่งมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ 1 / 2542 ลงวันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2542

(2) คำสั่งมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ 633 /2540 ลงวันที่ 10 ตุลาคม 2540

(3) โครงการวิจัยเรื่อง "การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283"

(4) ระเบียบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีว่าด้วยเงินอุดหนุนการวิจัย พ.ศ. 2539

(5) หลักเกณฑ์การใช้จ่ายเงินอุดหนุนการวิจัย

(6) หมายเลขบัญชีเงินฝากออมทรัพย์ ชื่อบัญชีโครงการวิจัย ธนาคารไทยพาณิชย์ (มหาชน)จำกัด สาขาย่อยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พร้อมรายชื่อผู้มีอำนาจสั่งจ่ายเงิน และสำเนาหน้าแรกของสมุดบัญชีดังกล่าว

ข้อ 3. ***ผู้รับทุน***จะดำเนินการตามวัตถุประสงค์และรายละเอียดของโครงการวิจัยที่กำหนดไว้ให้ครบถ้วนสมบูรณ์ ตามเอกสารหมายเลข 3 หากเกิดอุปสรรคไม่สามารถดำเนินการได้ด้วยประการใดก็ตาม***ผู้รับทุน***จะรีบรายงานให้ผู้ให้ทุนทราบทันทีเพื่อพิจารณาหาทางแก้ไขหรือดำเนินการตามที่เห็นสมควรต่อไป

ข้อ 4. รายชื่อหัวหน้าโครงการ ผู้ร่วมทำการวิจัย และรายละเอียดของโครงการตามที่ปรากฏแนบท้ายสัญญานี้ ***ผู้รับทุน***จะเปลี่ยนแปลงไม่ได้นอกจากจะได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจาก***ผู้ให้ทุน***ก่อน

ข้อ 5. ***ผู้รับทุน***จะปฏิบัติตามระเบียบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ว่าด้วย เงินอุดหนุนการวิจัย พ.ศ. 2539 รวมทั้งหลักเกณฑ์และวิธีปฏิบัติในการขอรับเงินอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งกำหนดขึ้นใช้ในขณะนี้และจะกำหนดขึ้นใช้ในภายหน้า

ทั้งนี้ โดยถือว่าระเบียบรวมทั้งหลักเกณฑ์และวิธีปฏิบัติข้างต้นนั้น เป็นส่วนหนึ่งของสัญญา

ข้อ 6. ***ผู้รับทุน***จะควบคุมการใช้เงินทุนให้เป็นไปอย่างประหยัดและจัดเตรียมหลักฐานบัญชีการจ่ายเงินเพื่อให้***ผู้ให้ทุน***ตรวจสอบได้ทุกโอกาส

ข้อ 7. ***ผู้รับทุน***ยินยอมให้ ***ผู้ให้ทุน*** หรือผู้ที่ให้ทุนมอบหมายเข้าไปในสถานที่ทำงานของ***ผู้รับทุน***หรือสถานที่ที่ผู้รับทุนทำการวิจัยอยู่ เพื่อประโยชน์ในการติดตามและประเมินโครงการได้

ข้อ 8. ***ผู้รับทุน***จะนำส่งผลงานดังนี้

(1) รายงานความก้าวหน้าพร้อมรายงานการเงินงวดที่ 1/2544

(2) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์พร้อมรายงานการเงินงวดที่ 2/2544 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2545

(3) เอกสารสรุปผลงานวิจัย ในรูปแบบและภาษาที่เหมาะสมสำหรับการประชาสัมพันธ์เผยแพร่ต่อประชาชนทั่วไป โดยส่งพร้อมกับรายงานฉบับสมบูรณ์และตามที่***ผู้ให้ทุน***กำหนดเป็นคราว ๆ ไป

(4) การเสนอผลงานด้วยวาจา(Oral Presentation) ตามที่***ผู้ให้ทุน***กำหนดเป็นคราว ๆ ไป

ข้อ 9. กรรมสิทธิ์ในผลงานวิจัย เป็นกรรมสิทธิ์ของ***ผู้ให้ทุน***(เว้นแต่จะมีการตกลงเป็นอย่างอื่นในภายหลัง) ส่วนผลประโยชน์ซึ่งเกิดจากการนำผลการวิจัยและพัฒนาไปใช้ในเชิงพาณิชย์ให้แบ่งกัน ระหว่างมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี กับ ***ผู้รับทุน***

ข้อ 10. ในการเผยแพร่ข้อมูล ข่าวสารอันเกี่ยวกับผลงานวิจัย ในสิ่งพิมพ์ใดหรือสื่อใดในแต่ละครั้ง ***ผู้รับทุน***ต้องระบุข้อความว่า "ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี" หรือข้อความอื่นที่มีความหมายเหมือนกัน

ข้อ 11. ในกรณีที่มีผู้ร่วมวิจัยหลายคน ***ผู้รับทุน***จะต้องเป็นผู้ตรวจสอบดูแลผู้ร่วมวิจัยทุกคนให้ปฏิบัติตามระเบียบ หลักเกณฑ์และวิธีปฏิบัติที่เกี่ยวข้องของ***ผู้ให้ทุน***อย่างเคร่งครัด

ข้อ 12. การระงับงานชั่วคราวและการบอกเลิกสัญญา

(1) ***ผู้ให้ทุน***มีสิทธิ์ระงับงานชั่วคราวหรือบอกเลิกสัญญานี้ได้ ถ้า***ผู้ให้ทุน***เห็นว่า***ผู้รับทุน***ไม่ได้ปฏิบัติงานด้วยความชำนาญหรือด้วยความเอาใจใส่ในวิชาชีพเท่าที่พึงคาดหมายได้จากนักวิจัยในระดับเดียวกัน หรือมิได้ปฏิบัติตามข้อสัญญาและเงื่อนไขที่กำหนดในสัญญานี้ ในกรณีเช่นนี้ ***ผู้ให้ทุน***จะมีหนังสือแจ้งให้***ผู้รับทุน***ทราบ และการระงับงานชั่วคราวหรือบอกเลิกสัญญาดังกล่าวจะมีผลในเวลาไม่น้อยกว่า 60 วัน นับถัดจากวันที่***ผู้รับทุน***ได้รับหนังสือบอกกล่าวนั้น

(2) ***ผู้รับทุน***มีสิทธิ์บอกเลิกสัญญาได้ ถ้า***ผู้ให้ทุน***มิได้ปฏิบัติหน้าที่ความรับผิดชอบตามที่สัญญาระบุไว้ ในกรณีเช่นนี้ ***ผู้รับทุน***จะต้องมีหนังสือถึง***ผู้ให้ทุน*** ระบุรายละเอียดถึงสาเหตุและเหตุผลในการขอเลิกสัญญา ถ้า***ผู้ให้ทุน***มิได้ดำเนินการแก้ไขให้เป็นที่พอใจในระยะเวลา 30 วัน นับถัดจากวันที่ได้รับหนังสือบอกกล่าวนั้น ***ผู้รับทุน***มีสิทธิบอกเลิกสัญญาได้

(3) ในกรณีที่***ผู้รับทุน***ไม่สามารถทำการวิจัยให้เสร็จตามที่ได้ตกลงไว้ ***ผู้รับทุน***ยินยอมคืนเงินอุดหนุนการวิจัยพร้อมทั้งเครื่องมือ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์ที่รับไปแล้วทั้งหมดหรือบางส่วนทั้งนี้ให้อยู่ในดุลพินิจของ***ผู้ให้ทุน***

ข้อ 13. ***ผู้ให้ทุน***เป็นเจ้าของเครื่องมือ อุปกรณ์ หรือครุภัณฑ์ใด ๆ ที่***ผู้รับทุน***ได้จัดซื้อโดยทุนทรัพย์ของ***ผู้ให้ทุน*** จนกว่าจะมีการตกลงเป็นอย่างอื่น

ข้อ 14. ***ผู้รับทุน***จะใช้และบำรุงรักษาครุภัณฑ์การวิจัยของ***ผู้ให้ทุน***ให้อยู่ในสภาพดี ใช้การได้อยู่เสมอ และ***ผู้รับทุน***ยินยอมให้***ผู้ให้ทุน***หรือผู้ที่ได้รับมอบหมายจาก***ผู้ให้ทุน***ตรวจตราครุภัณฑ์การวิจัยซึ่งเป็นทรัพย์สินของ***ผู้ให้ทุน***ได้ทุกขณะและทุกโอกาส และเมื่อเสร็จสิ้นการวิจัยตามโครงการแล้ว ***ผู้รับทุน***จะส่งคืนครุภัณฑ์ให้แก่***ผู้ให้ทุน***ทันที นอกจากจะมีการตกลงกันเป็นอย่างอื่น

ข้อ 15. การบอกกล่าว

บรรดาคำบอกกล่าวหรือการให้ความยินยอมหรือความเห็นชอบใด ๆ ตามสัญญานี้ต้องทำเป็นหนังสือและจะถือว่าได้ส่งไปโดยชอบแล้ว หากได้จัดส่งทางหนึ่งทางใดดังต่อไปนี้ คือ

(1) ส่งมอบโดยบุคคลแก่ผู้แทนที่ได้รับมอบหมายของคู่สัญญาแต่ละฝ่าย

(2) ทางไปรษณีย์ลงทะเบียน

(3) ทางโทรเลข โทรพิมพ์ หรือโทรสาร แล้วยืนยันเป็นหนังสือโดยเร็วไปยังชื่อและที่อยู่ของคู่สัญญา ดังต่อไปนี้

ก. ที่อยู่ของ***ผู้ให้ทุน***

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี

อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

ข. ที่อยู่ของ***ผู้รับทุน***

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี

อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

สัญญานี้ทำขึ้นสองฉบับมีข้อความตรงกัน คู่สัญญาได้อ่านและเข้าใจข้อความในสัญญานี้ โดยตลอดแล้ว จึงได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญต่อหน้าพยาน และต่างเก็บไว้ฝ่ายละหนึ่งฉบับ

(ลงชื่อ)_____ ***ผู้ให้ทุน***

(ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด)

ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

ผู้รับมอบอำนาจจากอธิการบดี

(ลงชื่อ)_____ ***ผู้รับทุน***

(อาจารย์ ดร. วิภา สุจินต์)

หัวหน้าโครงการวิจัย

(ลงชื่อ)_____ ***พยาน***

(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวณีย์ รัตนพานี)

หัวหน้าสถานวิจัย

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

(ลงชื่อ)_____ ***พยาน***

(นางพรประภา ช้อนสุข)

เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยและพัฒนา

c:/contra41.doc

เอกสารหมายเลข ....๕....

(แบบ ว1-ด สำหรับโครงการวิจัยสนับสนุนและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่)

แบบเสนอโครงการวิจัย

ประกอบการของบประมาณเพื่อการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544

(ประเภทเงินอุดหนุนการวิจัยเพื่อสนับสนุนการสร้างและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่)

ทิศทางของการวิจัย งานวิจัยนำประเทศไปสู่การพึ่งตนเอง

แผนวิจัย สร้างเทคโนโลยี หรือวิธีการใช้เทคโนโลยีในประเทศ

หัวข้อวิจัย การวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพและชีวเคมี เพื่อการประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาและพัฒนาประเทศ

ส่วนที่ 1 : สาระสำคัญของโครงการวิจัย

1. ชื่อโครงการวิจัย และรหัสหรือทะเบียนโครงการวิจัยของหน่วยงาน(ถ้ามี)

   (ไทย) การแยกยีนไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio alginolyticus* สายพันธ์ 283

   (English) Isolation of a chitinase from a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* 283

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย และที่อยู่

สาขาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา

2. คณะผู้วิจัย และสัดส่วนที่ทำงานวิจัย (%)

   (ไทย) ดร.วิภา สุจินต์ สัดส่วนงานวิจัย (100%)

   (English) Dr. Wipa Suginta, 100%

3. <u>เป็นส่วนหนึ่งของโครงการใหญ่</u> / เป็นโครงการเดี่ยว

   โครงการเดี่ยว

4. ในกรณีที่โครงการวิจัยนี้ <u>ทำการวิจัยร่วมกับหน่วยงานอื่น</u> โปรดระบุ <u>ชื่อหน่วยงาน</u> และ <u>ลักษณะของการร่วมงาน</u> นั้นด้วย

   ไม่มี

5. ประเภทของงานวิจัย

   งานวิจัยประยุกต์

6. สาขาวิชาการ ที่ทำการวิจัย

   ชีวเคมี

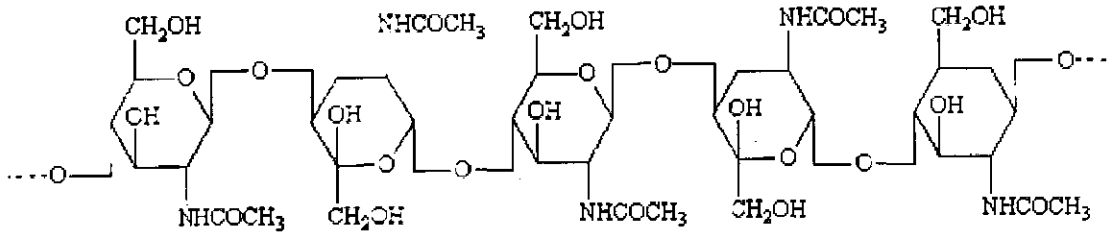
7. คำสำคัญของเรื่องที่ทำการวิจัย (keywords)

(ไทย) ไคติเนส ชนิดเอ/ การแยกยีน

(English) Chitinase *A*/Gene Isolation

8. ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (reviewed literature)

ไคติน(chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ที่เรียก *N*-acetylglucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคลซิดิกที่ตำแหน่ง $\beta 1 \rightarrow 4$ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของโพลีเมอร์ของไคติน

ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 10^{10} ถึง 10^{11} ต่อปี [1] ดังนั้น จึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเภสัชกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ

เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร เช่น อาหารทะเลแช่แข็ง อาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมอย่างเห็นได้อย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะนี้การย่อยสลายไคตินโดยการใช้เอ็นไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมี

---

[1] Gooday, G.W. (1994) In C. Ratledge (ed.) Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 279-312

ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิกิริยาการย่อยสลาย

ในธรรมชาติการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอ็นไซม์สามตัวด้วยขั้นตอนหลัก ๆ คือไคตินโพลีเมอร์ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์เอ็นโดไคติเนสให้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์ หลังจากนั้นโอลิโกเมอร์จะถูกย่อยต่อไปให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ด้วยเอ็นไซม์เอ็กโซไคติเนส หรือไคโตไบเอส (chitobiase) ขั้นตอนสุดท้ายคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอ็นไซม์เอ็นอะซิทิลกลูโคลซะมินิเดส (N-acetyl glucosaminidase) [2]

เอ็นไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไปเช่น ที่ส่วนต่างของพืช และระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล และสัตว์เคี้ยวเอื้อง หน้าที่ของเอ็นไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีแตกต่างกันไป เช่น เกี่ยวข้องในขบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา[3-5] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเอ็นไซม์นี้มีส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่[6,7] มีส่วนช่วยในการย่อยสารอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลงและปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาทอง ปลาเทร้า ปลาซีบาส เป็นต้น[8-10] นอกจากนี้เอ็นไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) เก่าที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา[11] ส่วนในพืชเอ็นไซม์นี้มีส่วนในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช[12-13] และขบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช[14]

---

[2] Davis, B., and Eveleigh, D.E. (1984) *In Chitin, Chitosan, and Related enzymes* (Zakikas, J.P., ed.) Academic Press, New York. 160-179.

[3] Papavizas, C.G. (1985) *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54

[4] Cabib, E. (1987) *In Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 59-101

[5] Kuranda, M., and Robbins., P.W. (1991) *J. Biol.Chem.* 266, 19758-19767

[6] Srivastava, A.K., Defago, G., and Boller, T. (1985) *Experientia,* 41, 1612-1613

[7] Sivan, A., and Chet, I. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135, 675-682

[8] Jeuniaux, C. (1966) *Methods Enzymol.* 8, 644 -650

[9] Okutani, K. (1977) *Proc. First. Int. Confer. Chitin/Chitosan*, Boston MA (USA) April 11-13, 554- 562

[10] Okutani, K. (1967) *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst.* 10, 1-47

[11] Spindler-Barth, M. (1993) *In Chitin Enzymol.* 75-82

[12] Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., and Vogeli, U. (1983) *Planta* 157, 22-31

[13] Pleban, S., Chernin, L., and Chet, I.(1997) *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 284-288

[14] de Jong, A. J., Cordewener, J., lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerchhove, J., van Kammen, A., and de Vries, S.C.(1992) *The Plant Cell* 4, 425-433

ได้มีการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) ในแฟมิลี Vibrionaceae เป็นแหล่งเอ็นไซม์ไคติเนสที่สำคัญ ในธรรมชาติแบคทีเรียนี้จะผลิตและหลั่งเอ็นไซม์ออกจากเซลล์เพื่อย่อยสลายไคตินที่สะสมหรือเป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น สาหร่ายสีเขียว ไดอะตอม เป็นต้น ให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของเซลล์[15-17] ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแหล่งเอ็นไซม์ที่สำคัญต่อขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioconversion process) ได้มีการวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาทางโมเลกุลเพื่อศึกษาองค์ประกอบของระบบยีนไคติเนสในแบคทีเรีย[18,19] แต่การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์นี้มีเพียงในเชื้อแบคทีเรียที่สกัดจากดิน *Serratia marcescens*[20] เป้าหมายหลักของงานวิจัยทางด้านโครงสร้างเพื่อเข้าใจกลไกการทำงานการของเอ็นไซม์โดยละเอียดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอ็นไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เช่นการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา[21] การเกษตร เช่น การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่างๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่ว อ้อย เป็นต้นให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านโรคราต่าง ๆ[22] และทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การกำจัดกากของเสียไคตินและนำผลิตผลจากการย่อยไคตินไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และการเกษตร[23,24]

9. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ 283 งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยระดับปริญญาเอกของผู้วิจัยที่ได้ทำการศึกษาเอ็นไซม์ไคติเนสในเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae*[25] เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการทดลองขั้นต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้ผลิต

---

[15] Yu, C., Lee, A.M., Bassler, B.L., and Roseman S. (1991) *J. Biol. Chem.* 25, 266(36), 24260-24267

[16] Montogomery, M.T., and Kirchman, D.L. (1993) *App. Environ. Microbiol.* 59 (2), 373-379

[17] Bassler, B.L., Yu, C., Lee, Y.C., and Roseman, S. (1991) *J. Biol. Chem.* 25, 266(36)24276-86

[18] Watanabe, T., Oyanagi W., Suzuki, K., and Tanaka, H. (1990) *J. Bacteriol.* 17 (7), 4017-4022

[19] Svityl, A.L., Chadhain, S.M.N., Moore, J.A., and Kirchman, D.L. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 408-413

[20] Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., Vorgias, C.E.(1994) *Structure* 15,2(12),1169-80

[21] Wang, S.H., Zheng, H.J., Dissanayake, S., Cheng, W.F., Tao, Z.H., Lin, S.Z., Piessens, W.F. (1997) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(4), 474-481.

[22] Lorito, M., Woo, S.L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F.(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 7,95(14),7860-7865

[23] Carroad, P.A., and Tom, R.A.(1978) *J. Food. Sci.* 43, 1158-1161

[24] Cosio, I.G., Fisher, R.A., and Carroad, P.A. (1982) *J. Food Sci.* 47, 901-905

เอ็นไซม์ไคติเนสในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสมากกว่าหนึ่งชนิด[26] ดังนั้น แบคทีเรียนี้จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาระบบยีนและโครงสร้างของเอ็นไซม์เพื่อเปรียบเทียบกับระบบยีนของเอ็นไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ในการวิจัยได้แบ่งขั้นตอนการทำวิจัยเป็นสองหัวข้อหลักดังนี้คือ

1. การแยกยีนไคติเนส จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* 283
2. การโคลนยีนไคติเนส ในแบคทีเรีย *E. coli* โดยมีเป้าหมายในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ไคติเนสในอนาคต

10. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถเข้าใจระบบของยีนไคติเนสในเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio*
2. เป็นการเตรียมเอ็นไซม์ที่จะใช้ศึกษาโครงสร้างสามมิติเพื่อความเข้าใจในกลไกการทำงานของเอ็นไซม์นี้อย่างละเอียด
3. มีแนวทางในการวิจัยในอนาคตที่จะมุ่งไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอ็นไซม์นี้ให้เหมาะสมเพื่อนำเอ็นไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านการแพทย์ การอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม

11. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานในมหาวิทยาลัยหรือสถาบันวิจัยที่ทำงานเกี่ยวกับการแพทย์หรือการสาธารณสุข เกี่ยวกับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อต่าง ๆ
2. หน่วยงานภาครัฐที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการเกษตร เช่น กรมพัฒนาส่งเสริมการเกษตร
3. หน่วยงานภาคอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดมลภาวะที่เกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อม

---

[25] Suginta, W., Robertson, P.A., Austin, B., Fry, S.C., Fothergill-Gilmore, L.A.(2000) *J. Appl. Microbiol.* 89(1),76-84

[26] Suginta, W. (1998) *Ph.D. Thesis*, Edinburgh University, 129-130

12. ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง และคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ท่านทำ (related work and similar studies)

1. งานวิจัยของกลุ่มวิจัยที่ประเทศญี่ปุ่นนำโดย Wanatabe ที่ภาควิชา Applied Biological Chemistry; Faculty of Agriculture, Niigata University ที่ทำการวิจัยเกี่ยวกับการแยกยีนไคติเนสในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans* และทำการโคลนยีนนี้เข้าไปในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* งานวิจัยต่อมาคือการใช้เทคนิคทาง mutagenesis เพื่อศึกษากรดอมิโนที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายสับเสตรท นอกจากนี้ยังศึกษาโครงสร้างของ chitin binding domain ต่อบทบาทในการย่อยสับเสตรท ตัวอย่างผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ได้แก่

- J. Biol. Chem. (1993) 5;268(25):18567-72
- FEBS Lett. (2000) 7;476(3):194-7.
- J. Biol. Chem. (2000) 5;275(18):13654-61.

2. งานวิจัยของกลุ่มวิจัยที่มหาวิทยาลัยมหิดลนำโดย ศ.ดร.อมเรศ ภูมิรัตน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยทำการแสดงออกของยีนไคติเนสที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* ในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* นอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ไคติเนสในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans* No.4.1.ตัวอย่างผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ได้แก่

- Curr. Microbiol. (1999) 39(3):134-40
- Gene. (1996) 7;179(1):119-26

3. งานวิจัยของ Perrakis ที่ Cancer Institute, Department H2 ประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์ไคติเนสในเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* นอกจากนี้ยังศึกษาโครงสร้างของ immunoglobulin-like domain และวิวัฒนาการของ domain นี้สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตัวอย่างผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ได้แก่

- Fold Des.(1997) 2(5):291-4.
- Structure.(1994)15;2(12):1169-80.

13. เอกสารอ้างอิง (reference)

ดูรายละเอียดในหัวข้อที่ 9 และ 10.

14. ระเบียบวิธีวิจัย

1. การค้นข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อเป็นการวางแนวทางในการปฏิบัติงานในห้องทดลอง
2. การดำเนินการทดลองให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ผลการทดลอง รวมถึงการนำเสนอผลการศึกษาและเปรียบเทียบผลการศึกษากับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ ที่ได้ตีพิมพ์แล้ว เพื่อนำไปสู่ข้อสรุปและแนวทางในการศึกษาวิจัยที่ต่อเนื่องขั้นต่อไป
3. การจัดเตรียบเอกสารเพื่อตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารในประเทศหรือวารสารนานาชาติ

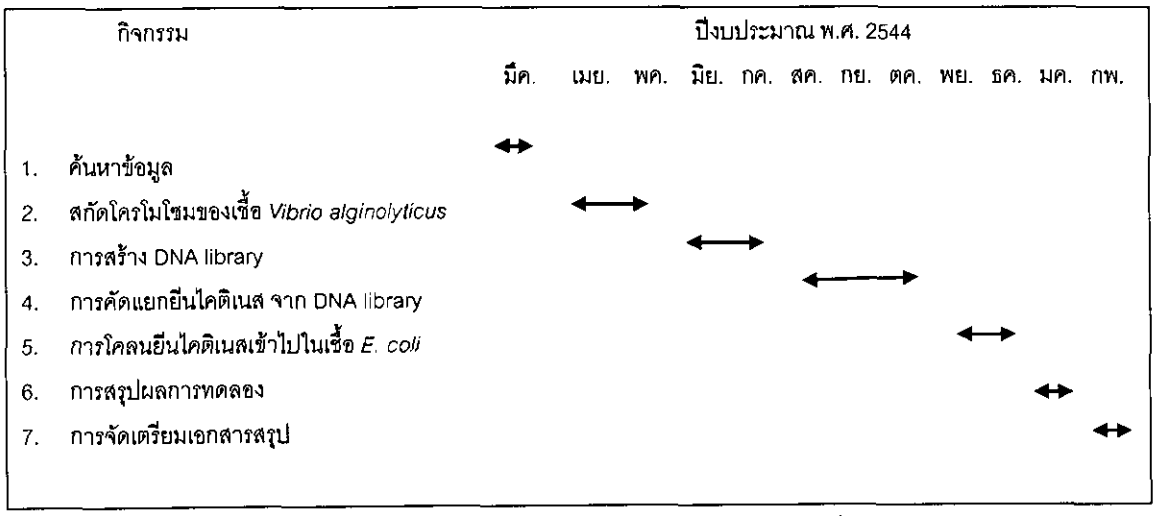
15. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนไคติเนสจาก เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ขอบข่ายงานวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นด้วยการสร้าง DNA library ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ติดตามด้วยการใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาหรือเทคนิคทาง PCR เพื่อคัดหายีนไคติเนสจาก DNA library ขั้นตอนสุดท้ายคือการโคลนยีนและการการแสดงออกของยีนไคติเนสในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

16. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

1 ปี

17. แผนการบริหารโครงการวิจัยและแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุ ขั้นตอนโดยละเอียด)



18. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

งานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนสาขาวิชาชีวเคมี ดังนั้น ความรู้และเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะถูกถ่ายทอดโดยตรงกับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาที่กำลังอยู่ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์

19. สถานที่ทำการทดลองและ / หรือเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการวิจัยชีวเคมี อาคารวิจัย F1

20. อุปกรณ์ในการวิจัย (ระบุรายละเอียดคุณลักษณะ)

20.1 อุปกรณ์การวิจัยที่มีอยู่แล้ว

อุปกรณ์ที่จำเป็นในงานวิจัยทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลส่วนใหญ่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการวิจัยชีวเคมี อาคารวิจัย F1

20.2 อุปกรณ์การวิจัยที่ต้องการเพิ่มเติม

- อุปกรณ์และน้ำยาล้างฟิล์มสำหรับทำ immonoblotting
- สารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นในการวิจัย เช่น restriction enzymes, modifying enzymes, DNA extraction kit, plasmid extraction kit เป็นต้น
- อุปกรณ์ล้างฟิล์ม x-ray

21. รายละเอียดงบประมาณที่เสนอขอ (เฉพาะปีที่เสนอขอ) ตามหมวดเงินประเภทต่าง ๆ (โปรดดูคำชี้แจง)

รายการค่าใช้จ่าย	งบฯที่เสนอขอปี 2544 (บาท)
1. ค่าอุปกรณ์ล้างฟิล์มและน้ำยา	5,000
2.ค่าสารเคมีต่าง ๆ	20,000
3. ค่าฟิล์ม x-ray	5,000
4. ค่าเอ็นไซม์	20,000
รวม	50,000

23. รายละเอียดงบประมาณที่เสนอขอในปีต่อ ๆ ไป ตามหมวดเงินประเภทต่าง ๆ แต่ละปีตลอดโครงการวิจัย (กรณีเป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง) และถ้าเป็นโครงการวิจัยต่อเนื่องที่ได้ดำเนินการมาแล้ว โปรดระบุงบประมาณที่ได้รับอนุมัติในปีที่ผ่านมาด้วย (โปรดดูคำชี้แจง)

    ไม่มี

24. รายงานความก้าวหน้าของโครงการวิจัย (กรณีเป็นโครงการต่อเนื่อง)

    ไม่มี

25. คำชี้แจงอื่น ๆ (ถ้ามี)

    ไม่มี

(ลายเซ็น)

(.....)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 31 เดือน มกราคม พ.ศ. 2544

(ลายเซ็น)

(.....)

หัวหน้าสาขา

วันที่ 31 เดือน ม.ค. พ.ศ. 2544

(ลายเซ็น)

(.....)

หัวหน้าสถานวิจัย

วันที่ 31 เดือน ม.ค. พ.ศ. 44

ส่วนที่ 2 ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ(ภาษาไทย)นางสาว วิภา นามสกุล สุจินต์

   (ภาษาอังกฤษ) Miss Wipa Suginta

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี) ไม่มี

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์สาขาเคมี

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

   สาขาเคมี สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ประวัติการศึกษา

   2541-2543 รับทุน Wellcome Trust เพื่อทำวิจัยหลังปริญญาเอก ที่ภาควิชา Biomedical Sciences มหาวิทยาลัย Edinburgh ประเทศอังกฤษ

   2538-2541 ปริญญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเอดินเบิร์ก ประเทศอังกฤษ

   2533-2536 ปริญญามหาบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล

   2530-2533 ปริญญาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ ชีววิทยาระดับโมเลกุลของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หรือชุดโครงการวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละเรื่อง เป็นต้น

   การบริหารงานวิจัย :ชื่อแผนงานวิจัยหรือชุดโครงการวิจัย

   ไม่มี

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อเรื่อง ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการ

1. Suginta, W., and Svasti, J. (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, pp. 256-260.

2. Suginta, W., and Svasti, M.R.J. (1995) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *J. Sci. Soc. Thailand.* 21, 183-186.

3. Surarit, R., Svasti, M.R. J., Srisomsap, C., Suginta, W., Khunyoshyeng, S., Nilwarangkoon, S., Harnsakul, P. and Benjavongkulchai, E. (1995) Possible Use of

Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok., pp. 251-255

4. Suginta, W., Robertson, P.A.W., Austin, B., Fry, S.C., Fothergill-Gilmore, L.A. (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*, J. *Appl. Microbiol*, 89, 76-84

5. Suginta, W., Rigden, D.J., Estebeiro, P., Duncan, R.R., Ketdudat-Cairns, J., Fothergill-Gilmore, L.A. Gene Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Chitinase A from *Vibrio carchariae*. In preparation

6. Suginta, W., Karoulias, N., Aitkin, A., and Ashley, R.H. Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. Submitted.

งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อเรื่องและสถานภาพในการทำวิจัย

ร่วมงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนคอมเพล็กซ์ของ CLIC4/14-3-3 กับ Dr. Richard Ashley ที่ภาควิชา Biomedical Sciences มหาวิทยาลัย Edinburgh ประเทศอังกฤษและ Dr. Robert Charles Robinson ที่ Salk Institute, San Diego ประเทศสหรัฐอเมริกา

แผนการใช้จ่ายเงินอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544

Research Expenditure for Fiscal Year 2001

โครงการวิจัยเรื่อง การแยกยีนไลติกเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล Vibrio alginolyticus สายพันธุ์ 283

Name of Project

รายการค่าใช้จ่าย Expenditures	งบประมาณ (บาท) Budget (baht)		
	งวดที่ 1* 1st Installment	งวดที่ 2 2nd Installment	รวมทั้งหมด Total
1. ค่าจ้างชั่วคราว ประกอบด้วย โปรดแสดงรายละเอียด Temporary Wages (Show details)	—	—	—
รวมค่าจ้างชั่วคราว Total			
2. ค่าตอบแทน ใช้สอย วัสดุ ประกอบด้วย (โปรดแสดงรายละเอียด) Compensation, Service contracting, and nonrenewable materials Expenses (show details)			
1. ค่าสารเคมีสำหรับ พลาะเลี้ยงเชลล์	5,000.00		5,000.00
2. ค่าสารเคมีสำหรับสกัด genomic DNA	5,000.00		5,000.00
3. ค่าสารเคมีสำหรับสร้าง DNA library	5,000.00		5,000.00
4. ค่าเอ็นไซม์	10,000.00	10,000.00	20,000.00
5. สารเคมีสำหรับคัดกรอง เชื้อยีนไลติกเอนไซม์ DNA library			
- ใช้ Nitrocellulose membrane		5,000.00	5,000.00
- ค่าฟิล์ม X-ray		5,000.00	5,000.00
- ค่าน้ำยาล้างฟิล์ม		5,000.00	5,000.00
รวมค่าตอบแทน ใช้สอยและค่าวัสดุ Total			
3. ค่าครุภัณฑ์ ประกอบด้วย (โปรดแสดงรายละเอียด) Equipment (show details)	—	—	—
รวมค่าครุภัณฑ์ Total			
รวมทั้งสิ้น (1+2+3) Grand total	25,000.00	25,000.00	50,000.00

(ลงชื่อ).....หัวหน้าโครงการ

Head of Project

(อ.ดร.วิรา สุขินธ์)

18 / มี.ค. / 2544

เล้ว

19 มี.ค. 44

หมายเหตุ * ค่าใช้จ่ายรวมทั้งหมดของงวดที่ 1 เบิกได้ไม่เกินร้อยละ 50 ของค่าใช้จ่ายทั้งโครงการในแต่ละปี ยกเว้นกรณีที่

1) มีความจำเป็นต้องตั้งเบิกเกินกว่านี้ให้ทำบันทึกชี้แจงเหตุผลเสนอขออนุมัติจากผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาแนบมาด้วย

2) มีรายการครุภัณฑ์ ให้หักค่าครุภัณฑ์ทั้งหมดออกจากเงินอุดหนุนการวิจัยทั้งโครงการก่อน ส่วนงบฯ ที่เหลือให้เบิกจ่ายใน รายการค่าจ้างชั่วคราว ค่าตอบแทน ใช้สอยและค่าวัสดุ รวมกันแล้วไม่เกินร้อยละ 50

เอกสารหมายเลข 6

การเปิดบัญชีเงินฝากโครงการวิจัย

เอกสารประกอบสัญญาเลขที่ 46 / 2544

โครงการวิจัยเรื่อง ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในทะเล Vibrio alginolyticus สายพันธุ์ 283

ชื่อบัญชี มทส-โครงการ VIBRIO ALGINOLYTICUS

เลขที่บัญชี 707-2 12544-8

ธนาคาร ไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) **สาขาย่อย** มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายนามผู้มีอำนาจสั่งจ่าย

1. รศ. ดร. ทัศนีย์ สุโกศล — คณบดี
2. รศ. ดร. เสาวณีย์ รัตนพานี — หัวหน้าสถานวิจัย
3. อ. ดร. วิรัช สุจินต์ — หัวหน้าโครงการวิจัย

เงื่อนไขการสั่งจ่าย

ผู้มีอำนาจสั่งจ่าย 2 ใน 3

ลงนาม วิรัช สุจินต์

(อ. ดร. วิรัช สุจินต์)

ผู้รับทุน

บัญชีเงินฝากที่เคลื่อนไหวตลอดเวลา ธนาคารมีสิทธิ... ในการรักษาบัญชีนี้	
บัญชีออมทรัพย์ / ฝ	
707 2 12544 หรือน้อยกว่า	BY BR707
500 บาท	100 บาท

13/03/01 15:36 1058K*23 707 2 12544 BY BR707
NEW P/B NO. 00000279440

จดบันทึกรายการที่ใช้บริการ			
☐ ถอนเงินสด ☐ โอนเงินฝาก	☐ ATM	☐ ประกันอุบัติเหตุ	☐ พิทักษ์สุข
☐ ถอนเงินต่างสาขา ☐ ค่าธรรมเนียม	☐ TELE BANK	☐ บัตรเครดิต	☐ พิทักษ์ลิน
☐ เช็คธนาคาร ☐ ดอกเบี้ย	☐ SCB CASH	☐ ATS ชาวสยามไกล	☐ รักษ์สุข
☐ ตั๋วแลกเงิน ☐ ภาษี ณ ที่จ่าย	☐ SCB PARK.COM	☐ ATS อื่นๆ	☐ พิทักษ์ภัย
☐ ตั๋วแลกเงิน ☐ อื่นๆ	☐ ประกัน	☐ พรบ.รถยนต์	☐ เคหะบริการ

ฝาก-ถอน
ใช้สมุดบัญชีนี้ในเครื่องเทลเลอร์ ON-LINE

ชื่อบัญชี มทส.โครงการVIBRIO ALGINOLYTICUS
NAME
ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน)
THE SIAM COMMERCIAL BANK PUBLIC COMPANY LIMITED
สาขาย่อย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่บัญชี 707-2 12544-8
ACCOUNT NO

บัญชีเงินฝากออมทรัพย์
SAVINGS ACCOUNT

ผู้มีอำนาจลงนาม
AUTHORIZED SIGNATURE