บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 แบคทีเรีย

3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1.1 LB medium

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

yeast extract	5 กรัม
tryptone	10 กรัม
NaCl	10 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็งให้เติม Bacto agar 20 กรัมต่อลิตร ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

3.1.1.2 chitin medium

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

yeast extract	0.5 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.3 กรัม
KH_2PO_4	6 กรัม
K_2HPO_4	10 กรัม
colloidal chitin (ภาคผนวกที่ 2)	0.2 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็งให้เติม Bacto agar 20 กรัมต่อลิตร ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

3.1.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อจาก slant 1 ลูพ (loop) ใส่ลงใน LB medium (ข้อ 3.1.1.1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะบนจานเพาะเลี้ยง LB agar ปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ (ประมาณ 18 ชั่วโมง) เลือกเชื้อ 1 โคโลนีจากจานเพาะเลี้ยงลงใน LB medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนสามารถวัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ได้ในช่วง 0.3-0.5 หน่วย (ประมาณ 4-6 ชั่วโมง)

3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อ

3.1.3.1 การเก็บในระยะสั้น

เก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลองไว้ใน LB medium ชนิดวุ้นแข็ง ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วยาว 30 เซนติเมตร ในลักษณะลาดเอียง โดยเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีจากจานเลี้ยงเชื้อไปขีด (streak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง ปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มที่ ปิดฝาจุกให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานไม่เกิน 1 เดือน เมื่อต้องการใช้เชื้อในการทดลองให้นำไปเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวต่อไปตามวิธีในข้อ 3.1.2

3.1.3.2 การเก็บในระยะยาว

เลี้ยงเชื้อใน LB medium จนเชื้อเจริญถึงระยะทวีคูณ (log phase) แล้วเก็บเชื้อในหลอดแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกลีเซอรอลที่ปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาขวดให้แน่น เก็บไว้มีอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บประมาณ 1 ปี

3.1.4 การตรวจสอบความสามารถในการเจริญและการผลิตไคทิเนสของ *Bacillus* sp.

เขี่ยเชื้อจาก LB plate (ข้อ 3.1.1.1) มาจุดลงบน chitin plate (ข้อ 3.1.1.2) โดยให้เขี่ยเชื้อมาจากโคโลนีเดียวกันลงในแต่ละจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 42 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยในระหว่างนี้ให้สังเกตด้วยว่าเชื้อเริ่มมีการเจริญและผลิตไคทิเนสออกมาเมื่อใดและวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น

3.1.5 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ทำการจำแนกสายพันธุ์โดยศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research : TISTR Culture Collection)

3.1.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อติดตามการเจริญของเชื้อและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส

ดูดเชื้อตั้งต้น 0.5 มิลลิลิตร (ข้อ 3.1.2) ใส่ลงใน chitin medium (ข้อ 3.1.1.2) pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพูขนาด 50 มิลลิลิตร ทั้งหมด 16 ขวด เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการดูดเชื้อออกมาทำ serial dilution ทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ใช้ sterile normal saline เป็นตัวเจือจาง โดยเรียงหลอดทดลองที่บรรจุ sterile normal saline ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แต่ละหลอดลงใน rack ใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดเชื้อขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเชื้อให้เข้ากันกับ normal saline และดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 2 ผสมเชื้อให้เข้ากันกับ normal saline แล้วดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำเช่นเดียวกันในหลอดที่ 4 จะได้ serial dilution ที่มีความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ จากนั้นใช้ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อจานละ 0.1 มิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 2 จาน โดยดูดจากความเข้มข้นต่ำมายังความเข้มข้นสูง จากนั้นเทวุ้นเหลว (ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดและแช่อยู่ใน water bath ที่

อุณหภูมิ ~50 องศาเซลเซียส) ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออยู่ หมุนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เชื้อกระจายทั่วจาน แล้วปล่อยให้วุ้นแข็งตัว นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ในจานที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณจำนวนโคโลนีต่อ 1 มิลลิลิตร ส่วนวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสทุก 8 ชั่วโมง ให้ดูดเชื้อจากขวดเดิมออกมา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด นำไปปั่นในที่เย็น ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่ได้เพื่อนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อไป

3.2 การวัดแอคติวิตีของไคทิเนสด้วยวิธีวัดสี (Colorimetric method)

ทำตามวิธีของ Imoto และ Yagishita (1971) ซึ่งได้ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Schales (1945) เป็นการวัดสมบัติรีดิวซ์ของผลิตภัณฑ์จากการที่เกิดจากไคทิเนสย่อยไคทิน ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้จะไปรีดิวซ์เฟอร์ริกไซยาไนด์ซึ่งมีสีเหลืองให้เป็นเฟอร์โรไซยาไนด์ซึ่งไม่มีสี

เติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ คอลลอยดัลไคทินเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 1.3) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 15 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ค่อยๆ ดูดส่วนใสออกมา 1 มิลลิลิตรด้วยปิเปตอัตโนมัติใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 1.11) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยกระดาษฟอยล์ ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรเทียบกับน้ำกลั่น

หลอดควบคุม (control) ให้ใส่คอลลอยดัลไคทินภายหลังการต้มในน้ำเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยา

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด N-acetylglucosamine 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) คือ จำนวนหน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม

3.3 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำตามวิธี microprotein assay ของ Bradford (1976) ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 1-10 ไมโครกรัม

นำสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Bradford (Bradford working solution) (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 2.2) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 20D ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 2.3) ความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร

3.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อย่างหยาบจาก *Bacillus cereus*

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างหยาบตามวิธีข้อ 3.2 แต่เปลี่ยนภาวะการทดลองจาก pH 5.0 เป็น pH 3.0-9.0 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 1.1-1.9) และเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 37 องศาเซลเซียส เป็น 25-70 องศาเซลเซียส

3.5 การทำไคทิเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน

ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยกเว้นที่ระบุไว้

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายเอนไซม์ปริมาณมาก โดยการเลี้ยงเชื้อบาซิลลัสใน LB medium แล้วทำการถ่ายเชื้อตั้งต้น (ข้อ 3.1.2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงใน chitin medium ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมฟุขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแยกเอนไซม์โดยการปั่นแยกเซลล์และไคทินออกด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง Beckman L-21C ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสคือสารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาทำให้เข้มข้นด้วยการกรองชนิดอัลทราและกลบด้วย aqua sorb เพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป (รูปที่ 6)

3.5.1 การทำโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพด้วยรีเจนเนอเรทเทดไคทิน (Regenerated chitin affinity)

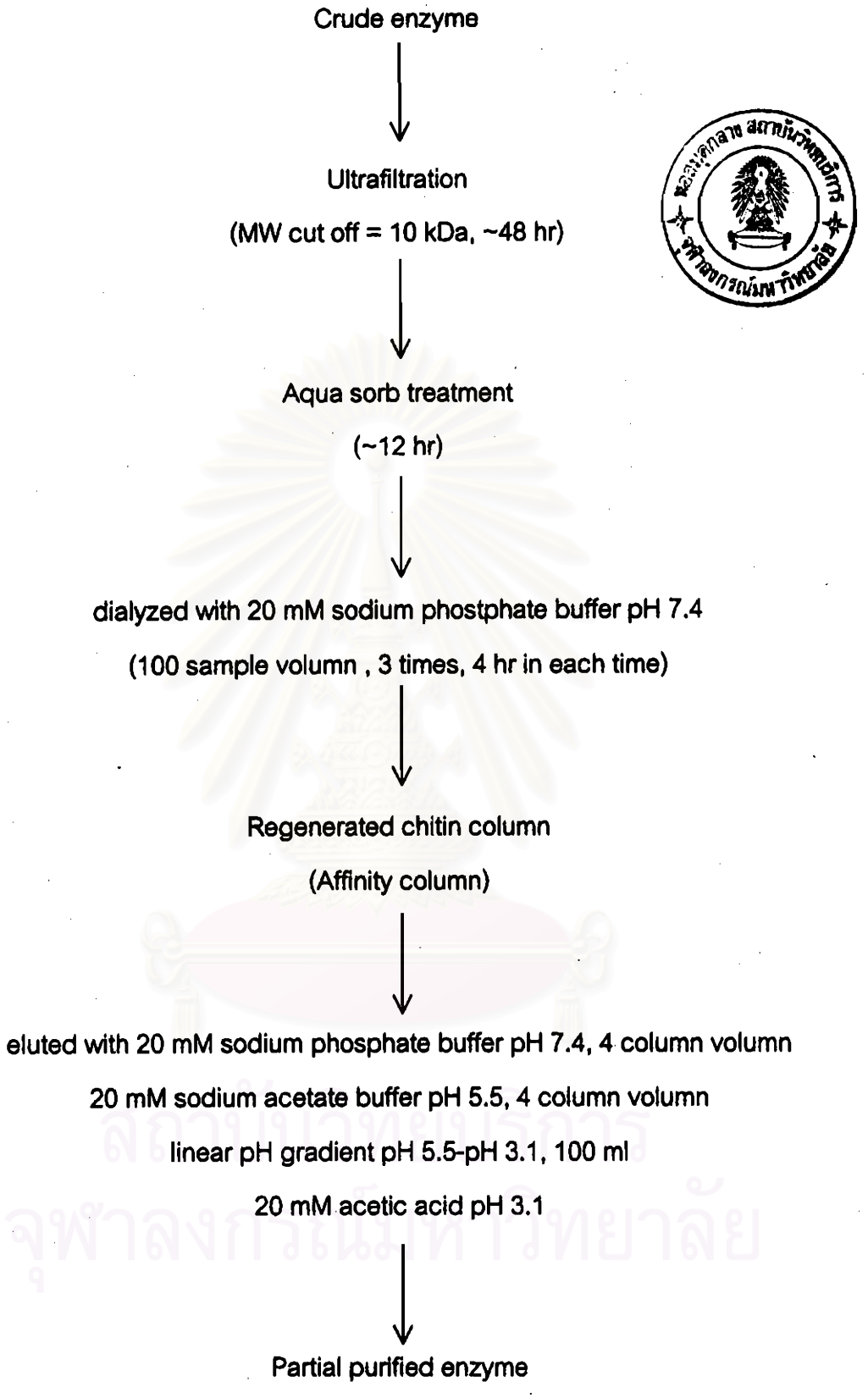
3.5.1.1 การเตรียมคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน

นำรีเจนเนอเรทเทดไคทิน (ภาคผนวกที่ 3) ที่เตรียมได้ ไปบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 10.5 x 1.9 เซนติเมตร ให้ได้ความสูงเป็น 7 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 3.1) ลงในคอลัมน์ที่บรรจุรีเจนเนอเรทเทดไคทินปริมาตร 4-5 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพที่สมดุลย์

3.5.1.2 การแยกเอนไซม์ด้วยคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน

ทำตามวิธีของ Watanabe และคณะ (1997)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นแล้วด้วยการกรองซนิดอัลทรา (MW cut off ของเมมเบรน 10,000 ดาลตัน) และกลบด้วย aqua sorb ปริมาตร 25 มิลลิลิตรไปไดอะไลซ์ (dialyse) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 100 เท่าของปริมาตรสารละลายเอนไซม์ 3 ครั้ง ครั้งละ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปเติมลงในคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินที่อยู่ในสภาพที่สมดุลย์แล้ว ชะด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 4 เท่าของคอลัมน์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วเปลี่ยนมาชะด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิลิตร pH 5.5 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 3.2) ปริมาตร 4 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะด้วย linear pH gradient 5.5-3.1 โดยเตรียมจากของสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ กรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH 3.1 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 3.3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และชะด้วยกรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH 3.1 เป็นลำดับสุดท้าย ตรวจสอบจนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์อีก (วัด A_{280} ได้เท่ากับ 0) เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ หาปริมาณโปรตีนรวมทั้งติดตามวัดค่า pH ของสารละลาย นำหลอดที่มีแอคติวิตีของไคทิเนสมารวมกัน นำไปไดอะไลซ์ในโซเดียมฟอสเฟต



รูปที่ 6 ขั้นตอนการทำไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน

บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 วัดปริมาตรรวม แอคติวิตีรวม และปริมาณโปรตีนรวมของเอนไซม์ ก่อนที่จะนำไปศึกษาต่อไป

3.5.2 การทำดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส (Disc-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ทำตามวิธีของ Davis (1964)

3.5.2.1 การเตรียมพอลีอะคริลาไมด์เจล 7.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 4.4) 2.5 มิลลิลิตร สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 4.2) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ๆ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 4.5) 50 ไมโครลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล (gel mold) ซึ่งเป็นแผ่นแก้วสี่เหลี่ยมขนาด 8.3 x 10 เซนติเมตร วางขนานกันห่างกัน 1.0 มิลลิเมตร จนสารละลายมีความสูงประมาณ 5.5 เซนติเมตร (ห่างจากขอบบน 2.8 เซนติเมตร) ค่อยๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของเจลอย่างรวดเร็วและเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจนจึงเทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าของเจล

เตรียม stacking gel 5 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 670 ไมโครลิตร สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.8 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 4.3) 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2.3 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันก่อนเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ๆ 30 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วเท stacking gel ลงในแบบเจลให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิลิตร ค่อยๆ ใส่หวี (comb) ลงไปทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นเจลแข็งแล้วจึงค่อยๆ ดึงหวีออก แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.2.2 การเตรียมสารละลายโปรตีน

นำสารละลายจากขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 4.6) ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วหยอดส่วนผสมนี้ลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้ ให้มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.2-110 ไมโครกรัม/หลุม

3.5.2.3 การทำอิเล็กโทรฟอรีซีส

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายทริส-ไกลซีน อิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 4.1) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นบนและชั้นล่างให้ท่วมปลายทั้ง 2 ข้างของแผ่นเจล หยอดสารละลายโปรตีน (ข้อ 3.5.2.2) ลงบนหลุมเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 20 มิลลิแอมแปร์ต่อแผ่นเจล เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งแถบสี (tracking dye) เคลื่อนที่ไปอยู่ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 3 มิลลิเมตร จึงปิดกระแสไฟฟ้า

3.5.2.4 การติดตามแถบโปรตีน

ถ่ายเจลจากข้อ 3.6.2.3 ออกจากแผ่นแก้ว แล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมโปรตีน (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 4.7) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ต่อจากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 4.8) หลายๆ ครั้งจนกระทั่งเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน

3.5.2.5 การติดตามแอคติวิตีของไคทิเนสในแผ่นพอลิอะคริลาไมด์เจล

ดัดแปลงจากวิธีของ Trudel และ Asselin (1989)

ทำเหมือนข้อ 3.5.2.1 แต่เติมไกลคอลไคทินเฉพาะใน separating gel ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซีสเสร็จแล้ว ถ่ายเจลออกจากแผ่นแก้ว นำไปแช่ลงในสารละลายโซเดียม-อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.0 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 6.1) เป็นเวลา 15-20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าเบาๆ เป็นครั้งคราว

นำเจลมาแช่ในสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 6.3) ที่เตรียมใหม่ๆ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงเทสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ออกแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นที่อุณหูมิห้องหลายๆ ครั้ง จนเห็นแถบแอคติวิตีของไคทิเนสเป็นแถบดำอย่างชัดเจนบนพื้นเจลสีขาว เมื่อนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลทราไวโอเลท

3.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์จาก *Bacillus cereus* ทั้งชนิดที่เป็นเอนไซม์หยาบและที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินแล้วมาศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการ ดังนี้

3.6.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

3.6.1.1 การเตรียมเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจล 12.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 5.4) 4.17 มิลลิลิตร สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 8.8 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 5.2) 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 3.33 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 5.5) 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล จนกระทั่งสารละลายสูงประมาณ 5.5 เซนติเมตร ค่อยๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็วและเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล

เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 670 ไมโครลิตร สารละลายทริส-เอสดีเอสบัฟเฟอร์ pH 6.8 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 5.3) 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ๆ 30 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วเท stacking gel ลงในแบบเจลให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิเมตร ค่อยๆ ใส่หวีลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นเจลแข็งแล้วจึงค่อยๆ ดึงหวีออก แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

I19018835

3.6.1.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ สารละลายผสมของเอลฟา-แลคตาบูมิน (α-Lactabumin) ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) โอวัลบูมิน (Ovalbumin) อัลบูมิน (Albumin) และ ฟอสฟอรลเลส บี (Phosphorylase b) น้ำหนักโมเลกุล 14,400 20,100 30,000 43,000 67,000 และ 94,000 ดาลตัน ตามลำดับ ละลายโปรตีนมาตรฐานในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2,930 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์โดยนำไปผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 5.6) ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตร ปิดฝาหลอดแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ ~100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้องก่อนนำไปหยอดลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างอยู่ในช่วง 5-110 ไมโครกรัมต่อหลุมเจล

3.6.1.3 การทำอิเล็กโทรฟอรีซีส

ทำเหมือนข้อ 3.5.2.3 แต่ใช้สารละลายทริส-เอสดีเอสอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 5.1) แทนสารละลายทริส-ไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์

3.6.1.4 การติดตามแถบโปรตีน

ถ่ายเจลจากข้อ 3.6.1.3 ออกจากแผ่นเจล นำมาย้อมสีโปรตีนตามวิธีข้อ 3.5.2.4

3.6.1.5 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสีน้ำเงินของโปรตีน และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล นำมาคำนวณหาอัตราการเคลื่อนที่ ดังนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

หาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

3.6.1.6 การตามแอคติวิตีของไคทิเนสในแผ่นเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจล

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Trudel และ Asselin (1989)

ทำเหมือนข้อ 3.6.1.1 แต่เติมไกลคอลไคทินเฉพาะใน separating gel ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซีสเสร็จแล้ว ถ่ายเจลออกจากแผ่นแก้ว นำไปแช่ในสารละลาย Triton X-100 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 7.2) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ นำเจลออกมาแช่ในสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 7.4) ที่เตรียมใหม่ๆ ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงเทสารละลายฟลูออเรสเซนซ์ออกแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องหลายๆ ครั้งจนเห็นแถบแอคติวิตีของไคทิเนสเป็นแถบดำอย่างชัดเจนบนพื้นเจลสีขาวเมื่อนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลทราไวโอเลท

3.6.2 การศึกษาผลของ pH และ อุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทไคทินแล้วตามวิธีข้อ 3.2 แต่เปลี่ยนภาวะการทดลองจาก pH 5.0 เป็น pH 3.0-9.0 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 1.1-1.6) และเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 37 องศาเซลเซียส เป็น 25-60 องศาเซลเซียส

3.6.3 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินแล้ว

ทำการหา pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (ข้อ 3.6.2) เมื่อได้ pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมแล้วทำการหาช่วงเวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ที่

อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมดังกล่าวโดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ แล้ววัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น นำผลที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างเวลาที่ใช้ในการบ่มและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเพื่อหาช่วงเวลาที่กราฟมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลา อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมดังกล่าว นำข้อมูลที่ได้มาพลอตกราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง 1/V กับ 1/[S] เพื่อหาค่า Km ของเอนไซม์

3.6.4 การศึกษาถึงความเสถียรของไคทิเนสที่ pH ต่างๆ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินแล้วมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3-12 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 1.1-1.9) ในอัตราส่วน 1 : 2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกมา 1 ส่วนมาปรับ pH เป็น 5 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5 ในอัตราส่วน 1 : 9 แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของไคทิเนสที่เหลือตามวิธีข้อ 3.2 เปรียบเทียบกับแอคติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์ (ที่เวลา 0 นาที pH 5 และวัดแอคติวิตีตามข้อ 3.2)

3.6.5 การศึกษาสับสเตรทของไคทิเนส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินแล้วไปบ่มกับไคทินและอนุพันธุ์ของไคทินชนิดต่างๆได้แก่คอลลอยดัลไคทิน ไคทินผงบริสุทธิ์ รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ไกลคอลไคทิน ไกลคอลไคโตแซน ไคทินผง (ไม่บริสุทธิ์ขนาด 60-mesh) ไคโตแซน (~90%deacetylation) เซลลูโลส และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (ความเข้มข้นของสับสเตรทแต่ละชนิดเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (W/V)) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 3.2

3.6.6 การตรวจสอบชนิดของไคทิเนสโดยวิธีการใช้สับสเตรทที่มีสี (Chromogenic method)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Roberts และ Selitrennikoff (1988)

เติมสารละลายเอนไซม์ 5 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย p-nitrophenyl-chitooligosaccharides ชนิดต่างๆ เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 15 นาที รอให้เย็น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เทียบกับ blank

หลอดควบคุม (control) ให้ต้มสารละลายในน้ำเดือดก่อน เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายสับสเตรท

blank ทำเหมือนตัวอย่างแต่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด p-nitrophenol 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง

3.6.7 **การตรวจสอบไกลโคโปรตีน** (glycoprotein) **ด้วยวิธีการย้อม** Periodic Acid Schiff (PAS) reagent

ทำตามวิธีของ Segrest และ Jackson (1972)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วไปทำดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสตามวิธีข้อ 3.5.2.1-3.5.2.3 จากนั้นนำเจลมาแช่ในสารละลายฟิกเซทีฟ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 8.1) ปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร 18 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายฟิกเซทีฟออกแล้วเติมสารละลายกรดเปอร์ริโอดิก (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 8.2) ลงไปให้ท่วมเจล ตั้งทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง ก่อนนำไปแช่ต่อในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่เตรียมใหม่ๆ (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 8.3) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลาย 1 ครั้ง หลังจาก 30 นาทีแรก เสร็จแล้วจึงนำเจลไปแช่ใน Schiff's reagent (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 8.4) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสีม่วงขึ้นที่แถบโปรตีนที่เป็นไกลโคโปรตีน เก็บรักษาแผ่นเจลไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6.8 การตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสในอาหารวุ้นแข็งที่มีคอลลอยดัลไคทิน

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Frandberg และ Schnurer (1994) เป็นการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์จากวงใส (clear zone) ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากไคทิเนสได้ทำการไฮโดรไลซ์คอลลอยดัลไคทินเป็น chitooligomers สายสั้นๆ

เตรียมจานเพาะเลี้ยงแบบวุ้นสำหรับตรวจสอบวงใส โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยคอลลอยดัลไคทิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) agar 2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) และโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 0.02 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.1 นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว แล้วจึงทำการเจาะหลุมด้วยแท่งแก้วกลวงที่อบฆ่าเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิลิตร ดูดสารตัวอย่างได้แก่ สารละลายเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วจาก *Bacillus cereus* สารละลายไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* ที่ใช้ในทางการค้าหยอดลงในหลุม โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 เป็นตัวควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย