บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) รุ่น Gyromax 737 บริษัท Amerex Instruments, Inc. U.S.A.

2. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 048 B บริษัท Dr. Ing. A. Hofmann, West Germany.

3. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Biofuge stratos บริษัท Kendo Laboratory Products, Germany.

4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore.

5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 บริษัท Spectronic Instrument, U.S.A.

6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 บริษัท PerkinElmer Instrument, U.S.A.

7. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S บริษัท Sartorius, U.S.A.

8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co.,Ltd., Japan.

9. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น J2-21 บริษัท ISSCO, U.S.A.

10. ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 บริษัท Sanyo Electronic Co., Ltd., Japan.

11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TW 20 บริษัท Julabo Labortechnik GMBH, Germany.

12. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น VSM-3 บริษัท Snelton Scientific Inc., U.S.A.

14. เครื่องโครมาโทกราฟี (ion exchange chromatography) รุ่น Econo บริษัท BioRad, U.S.A.

15. เครื่องอิเลคโทรโฟริซิสแบบแผ่น (slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual บริษัท BioRad, U.S.A.

16. เครื่องเก็บสารตัวอย่าง (fraction collector) รุ่น FRAC-100 บริษัท Pharmacia, U.S.A.

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ไตรบูไทริน (tributyrin) บริษัท Fluka, Switzerland.

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท J. T. Baker Inc., U.S.A.

ซอยโตน เปปโตน (soytone peptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

น้ำมันมะกอก (olive oil) บริษัท Bertolli, Italy.

2. เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

พารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท (*p*-nitrophenyl acetate) บริษัท Fluka, Switzerland.

พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) บริษัท Sigma, U.S.A.

ไอโซ-โพรพานอล (2-propanol) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท J. T. Baker Inc., U.S.A.

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

3. **เคมีภัณฑ์อื่น ๆ**

ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-gel A) บริษัท Bio-Rad, U.S.A.

อะคริลาไมด์ (acrylamide) บริษัท Sigma, U.S.A.

N,N'-เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-methylene bis acrylamide) บริษัท Sigma, U.S.A.

N,N,N',N'-เททระเมธิลีนไดอามีน (N,N,N',N'-tetramethylenediamine, TEMED) บริษัท Sigma, U.S.A.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) บริษัท Sigma, U.S.A.

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-200 (coomassie brilliant blue) บริษัท Fluka, Switzerland.

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) บริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England.

แอลฟา-แนพทิล อะซีเตท (α-naphthyl acetate) บริษัท Fluka, Switzerland.

ฟาสต์บลู บีบี ซอลท์ (fast blue BB salt) บริษัท Fluka, Switzerland.

ชุดโปรตีนมาตรฐาน บริษัท Promega, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. แยกแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตไลเปสจากตัวอย่างดินและน้ำ

1.1 เก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อแยกแบคทีเรียทนความร้อนสูงที่ผลิตไลเปส

เก็บตัวอย่างดินและน้ำ จากบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง เช่น บ่อน้ำพุร้อน บ่อพักน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ใส่ในภาชนะที่เก็บความร้อน นำตัวอย่างกลับมายังห้องปฏิบัติการ แล้วนำตัวอย่างบ่มในอาหารเหลวน้ำมันมะกอก (olive oil medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1)โดยใส่น้ำตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และใส่ดินตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวน้ำมันมะกอก บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียทนความร้อนสูงที่ผลิตไลเปสส่งออกมานอกเซลล์

จากนั้นนำแบคทีเรียที่เลี้ยงให้มีปริมาณมากขึ้นจากข้อ 1.1 มาหยดลงบนอาหารแข็งไตรบูไทริน (tributyrin agar plate) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วจาน บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่ทำให้เกิดวงใสรัศมีกว้างๆ ซึ่งแสดงว่าสามารถผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้มาก จากนั้นเขี่ยโคโลนีนั้นลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่แล้วบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเลือกโคโลนีที่มีวงใสอีก ทำซ้ำแบบนี้หลายๆ ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure cuiture) วัดขนาดวงใสโดยหักลบกับขนาดโคโลนีของแบคทีเรีย

1.3 ศึกษาความสามารถในการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ในอาหารเหลวน้ำมันมะกอก บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูการเจริญของเชื้อจากความขุ่นของอาหาร

2. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่แยกได้

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้บนอาหารแข็งเอียงน้ำมันมะกอก (olive oil slant agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเตรียมหัวเชื้อ

เลือกแบคทีเรียที่สร้างวงใสมากกว่า 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมันมะกอก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่ต่อด้วยหลอดวัดค่าการดูดกลืนแสงขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วเจือจางหัวเชื้อใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) น้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวน้ำมันมะกอกปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนใสที่ได้จากการปั่นด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 เพื่อแยกน้ำมันออก

5. การตรวจแอคติวิตีของไลเปส

ใช้วิธีดัดแปลงจากวิธีของ Marianne และคณะ (1991) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลาย A (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.1) 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.2) 45 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายผสม 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร โดยมีสับเสตรทแบลงค์ (substrate blank) คือสารละลายผสม 900 ไมโครลิตร เติมสารละลาย B 100 ไมโครลิตร และมีเอนไซม์แบลงค์ (enzyme blank) คือสารละลาย B 900 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกริยาด้วยการทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร หักลบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากปฏิกิริยาของสารละลายเอนไซม์กับเอนไซม์แบลงค์

กราฟมาตรฐานใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ความเข้มข้น 0-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท แล้วให้ พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะข้างต้น

6. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.3) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.4) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum alumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส (Perry, 1989)

7.1 การศึกษาอุณหภูมิ, ความเป็นกรดด่างและเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส

เตรียมสารละลายไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกตามวิธีการทดลองในข้อ 4 โดยแปรผันสภาวะการเลี้ยงตามตารางที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไลเปสในสภาวะต่างๆ

7.2 การศึกษาเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส

เนื่องจากจุดของเวลาในการบ่มในการทดลองที่ 7.1 ค่อนข้างห่างกันมาก จึงศึกษาเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสซ้ำอีกครั้งโดยวัดแอคติวิตีถี่มากขึ้นเป็นทุกๆ 6 ชั่วโมง เตรียมสารละลายไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกตามวิธีการทดลองในข้อ 4 ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสตามผลการทดลองในข้อ 7.1 วัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร, วัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและติดตามแอคติวิตีของไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 แสดงการแปรผันสภาวะในการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือก

ขวดที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	pH	เวลาที่บ่ม (ชั่วโมง)
1	60	6	12
2	60	6	48
3	60	8	12
4	60	8	48
5	70	6	12
6	70	6	48
7	70	8	12
8	70	8	48
9	65	7	24
10	65	7	24
11	65	7	24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. การทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

เตรียมสารละลายไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกตามวิธีการทดลองในข้อ 4 ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสตามผลการทดลองในข้อ 7.1 และ 7.2 จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ที่มีเมมเบรนการคัดขนาดโมเลกุล (molecular weight cut-off) 10,000 ดาลตัน นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ทำโดยผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจลด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการปั่นจากข้อ 4 ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออกโดยใช้ 0-1,000 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บลำดับส่วนละ 2 มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวบรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของไลเปสสูงเข้าด้วยกัน ลดปริมาตรตัวอย่างด้วยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ที่มีเมมเบรนการคัดขนาดโมเลกุล (molecular weight cut-off) 10,000 ดาลตัน วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ แอคติวิตีของไลเปสและปริมาณโปรตีน

9. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส (Native polyacrylamide gel electrophoresis) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3 x 10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3 x 10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.7) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ซับน้ำออก เทสารละลายผสมสแตกกิง

เจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.8) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.1) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโทรโฟรีซิส เติมอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอีเลคโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.6) หยอดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอีเลคโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลท์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วแล้วตัดเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู นำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.9) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.10) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ส่วนที่ 2 นำไปย้อมแอคติวิตี (activity staining) ทำโดยแช่เจลในสารละลายย้อมแอคติวิตี (ภาคผนวก ข หมายเลข 13) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบแถบสีที่เกิดขึ้น (Marianne และคณะ, 1991)

10. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการทำอีเลคโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) **ดัดแปลงจากวิธีของ** Laemmli (1970)

นำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน มาทำอีเลคโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3 x 10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3 x 10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.4) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ซับน้ำออก เทสารละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.5) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้ง

ทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.1) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโทรโฟริซิส เติมอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอีเลคโทรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานมาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.3) หยอดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอีเลคโทรโฟริซิสที่ 200 โวลท์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วแล้วตัดเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู นำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.9) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.10) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ส่วนที่ 2 นำไปแช่ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ Triton-X 100 ใน 0.1 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อดึง SDS ออก (Hummel และคณะ, 1996) แล้วนำไปย้อมแอคติวิตี (activity staining) ทำโดยแช่เจลในสารละลายย้อมแอคติวิตี (ภาคผนวก ข หมายเลข 13) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบแถบสีที่เกิดขึ้น (Marianne และคณะ, 1991) นำแผ่นเจลส่วนที่ 2 ที่มีแอคติวิตีของไลเปสไปเทียบกับแถบโปรตีนของเจลส่วนที่ 1 ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของไลเปสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

11. การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

11.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

นำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในปริมาณเท่าๆกัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 5 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส

11.2 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

นำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในปริมาณเท่าๆกัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 5 โดยแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 4.0-5.5

50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 6.0-7.0

50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 7.5-8.0

11.3 ความเสถียรของไลเปสต่ออุณหภูมิ

บ่มไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิในช่วง 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลือตามวิธีการในข้อ 5 โดยมีไลเปสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

11.4 ความเสถียรของไลเปสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ pH 4.0-8.0 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ดังระบุในข้อ 11.2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลือตามวิธีการในข้อ 5 โดยมีไลเปสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

11.5 ความเสถียรของไลเปสต่อสภาวะการเก็บ

นำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสและเติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์, 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน, 7 วันและ 14 วันแล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลือตามวิธีการในข้อ 5 โดยมีไลเปสที่ไม่ผ่านการเก็บเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยใช้เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร เท่ากันทุกสภาวะการเก็บในการวัดแอคติวิตี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. การศึกษารูปร่างลักษณะและสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือก

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีแอคติวิตีของไลเปสสูงที่สุดนำมาตรวจสอบรูปร่างและการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียและจัดจำแจกตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.(1994) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.(1986)

12.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกปลูกลงบนอาหารแข็งไตรบูไทริน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ศึกษารูปร่าง ขนาด สี ของโคโลนีที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว

12.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การติดสีแกรม นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งเพื่อให้เซลล์ติดกับแผ่นสไลด์ จากนั้นย้อมสีเซลล์โดยการหยดสารละลายแกรมคริสตัลไวโอเลต (Gram's crystal violet solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำแล้วย้อมด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) 1 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลและน้ำกลั่น แล้วย้อมด้วยสารละลายแกรมซาฟรานินโอ (Gram's safranin solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมสีเอนโดสปอร์ นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเลี้ยงให้เจริญเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หยดสารละลายมาลาไคท์กรีน (malachite green) (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ใช้ไฟลนใต้แผ่นสไลด์ให้เกิดเป็นไอ 1-2 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง ล้างด้วยน้ำ 30 วินาที จากนั้นย้อมด้วยสีซาฟรานินโอนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เอนโดสปอร์จะติดสีเขียว และเซลล์จะติดสีแดง

การเคลื่อนที่ นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาปลูกแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มเชื้อนาน 18-24 ชั่วโมง ถ้าการเจริญของเชื้อออกนอกรอยปักเชื้อหรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนแต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง

หลอดขุ่นกว่าเดิม แสดงว่าเชื้อเคลื่อนที่ได้ แต่ถ้าเห็นการเจริญและมีขอบเขตชัดเจนแสดงว่าให้ผลเป็นลบ

12.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

การสร้างคะตะเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือก ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสร้างคะตะเลสได้ แต่ถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นลบ

การเจริญในภาวะไร้อากาศ เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกลงในอาหารเหลวไธโอไกลโคเลต (thioglycolate broth) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อมีการเจริญ บันทึกเป็นผลบวก ถ้าไม่มีการเจริญ บันทึกเป็นผลลบ

การสร้างออกซิเดส หยดสารละลาย tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษกรอง แล้วใช้ลูปเขี่ยแบคทีเรียที่คัดเลือกกระจายให้ทั่วกระดาษกรอง ถ้าแบคทีเรียเป็นสีม่วงภายใน 10 วินาทีแสดงว่าสร้างออกซิเดสได้

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (phenol red broth base) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำตาลแต่ละชนิด สังเกตการสร้างกรดได้โดยแบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตสร้างกรดขึ้น ทำให้สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเหลือง ซึ่งเป็นผลบวก และสามารถสังเกตการสร้างแก๊สโดยการใส่หลอดดักแก๊ส (durham's tube)

การทดสอบรีดิวซ์ไนเตรต เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกลงในอาหารเหลวไนเตรต (nitrate broth) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) บ่มเชื้อนาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ แอลฟาแนพทิลามีน (α-naphthylamine) (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) อย่างละ 5 หยด ถ้าสารละลายมีสีแดงอมชมพูเกิดขึ้น หรือไม่เกิดสีในตอนแรกและเมื่อเติมผงสังกะสีเข้าไปก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงว่ามีการรีดิวซ์ไนเตรต แต่ถ้าเติมผงสังกะสีแล้วมีสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่าเป็นผลลบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การทดสอบเมทิลเรดและอะซีทิล เมทิล คาร์บินอล (methyl red and acetyl methyl carbinol)</u> เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) นาน 48 ชั่วโมง เติมน้ำยาทดสอบคือ สารละลายเมทิลเรด 5 หยด ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง บันทึกผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีเหลือง บันทึกผลเป็นลบ ส่วนการทดสอบอะซีทิล เมทิล คาร์บินอล โดยนำ 1 มิลลิลิตร ของน้ำเลี้ยงเชื้อมาเติม 0.6 มิลลิลิตร ของ 5 เปอร์เซ็นต์ แอลฟา-แนพทอล (α-napthol) ที่ละลายใน absolute ethanol (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ 40 เปอร์เซ็นต์ KOH ถ้าเกิดสีแดง บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลเป็นลบ

<u>การทดสอบการสร้างอินโดล</u> เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลวอินโดล (indole broth) (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) เป็นเวลา 2 วัน เติมสารละลายโคแวคส์ (kovac's solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) เพื่อตรวจสอบสารอินโดลที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าแบคทีเรียสามารถสร้างอินโดลได้จะเกิดสีแดงบนผิวหน้าอาหาร

<u>การทดสอบการย่อยแป้ง</u> เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารแข็งสตาร์ช (starch agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วราดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

<u>การทดสอบการใช้ซิเตรต</u> เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหารแข็งทดสอบการใช้ซิเตรต (simmons' citrate agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) นำไปบ่ม 1-2 วัน ถ้าเกิดสีน้ำเงินในอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่าเชื้อสามารถใช้ซิเตรตได้

<u>การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ</u> เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลวน้ำมันมะกอก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 วัน ถ้ามีการเจริญของเชื้อแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

<u>การทดสอบการเจริญที่ pH 5.7</u> เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลวน้ำมันมะกอกและปรับ pH เป็น 5.7 บ่มเชื้อ 1-5 วัน ถ้ามีการเจริญของเชื้อแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

<u>การทดสอบผลของ NaCl ที่มีต่อการเจริญ</u> เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลวน้ำมันมะกอก และมี NaCl ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไปบ่มเป็นเวลา 1-5 วัน ถ้ามีการเจริญของเชื้อแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย