หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือ

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 บริษัท Bausch & Lomb

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง Model J2-21 บริษัท Beckman

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) Tomy MC-15A

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงต่ำ Model Minor 35 บริษัท MSC Ltd

อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ (Shaking waterbath) Model 01-PF-623 บริษัท Heto

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) type B 5050 E และ type VT 5040 EK บริษัท Heraeus

เครื่องทำลายเซลล์ด้วยเสียงความถี่สูง (Sonicator) Model W 375 บริษัท Heat System Ultrasonic Inc.

หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) Model HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corperation

เครื่องวัด pH Model PHM 83 บริษัท Radiometer Ltd.

เครื่องวัดสภาพนำ (Conductivity meter) Model CDM บริษัท Radiometer Ltd.

Ultrarack Fraction Collector Model 2070 บริษัท LKB Productor Ab.

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas Chromatography) Model 3700 บริษัท Varian

เครื่องป้อนพลังงาน (Power Supply)

อุปกรณ์อิเลคโทรโฟริซิส

U.V. transilluminator Model TS-20 บริษัท UVP

กล้องถ่ายรูป Pentax super A Soft case 32650 พร้อมฟิล์มขาวดำ Kodak Tri-X Pan 400

ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) บริษัท Pipetman

2.1.2 ก๊าซ

อะเซทิลีน ของบริษัทสิทธิโชคเอนจิเนียริง จำกัด

เอทิลีนมาตรฐาน ของSupelco

อาร์กอน ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซ จำกัด

อากาศอัด ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารบก

ไนโตรเจน ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซ จำกัด

2.1.3 เคมีภัณฑ์

ก. เรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ของบริษัท BRL

ข. Diethylaminoethyl cellulose D11 บริษัท Whatman Bio System Ltd.

Phosphocellulose P11 บริษัท Whatman Bio System Ltd.

Hydroxylapatite Bio-gel HTP บริษัท Bio-Rad Laboratory

Sephadex G-100 Fine chemical บริษัท Phamacia

สารเคมีทั้งหมดที่กล่าวนี้เป็นเกรดวิเคราะห์ ส่วนสารเคมีอื่นนอกจากนี้ซื้อจากบริษัท Sigma chemical, บริษัท BDH, บริษัท Fluka เป็นต้น

2.1.4 ดีเอ็นเอที่ใช้ประกอบการศึกษา

ชนิดของดีเอ็นเอ	ขนาด (Kb)	ยีนเครื่องหมาย
pCK3 (Kennedy, C.)	27	Km^r, Tc^r
pSA30 (Cannon, F., 1979)	10.9	Tc^r
pBR322 (Boliva, F., 1977)	4.4	Tc^r, Amp^r
λ DNA	48.5	
ϕX174 DNA	5.4	

2.2 แบคทีเรีย

2.2.1 *Azospirillum* spp. ได้รับความอนุเคราะห์จาก ด.ร.นันทกร บุญเกิด กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2.2.2. *Escherichia coli* BD817 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือนมาตรฐานสำหรับการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด

2.3 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

2.3.1 Nutrient medium (NB) เป็นอาหารอุดม (rich medium) ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย nutrient broth 8 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3.2 อาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน (Nitrogen free medium)

(Döbreiner, J. and Day. J.M., 1974) ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 6.0 กรัม, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.0 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 0.1กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 กรัม, เฟอริคคลอไรด์ 0.01 กรัม, โซเดียมโมลิบเดต 0.002 กรัม, โซเดียมมาเลท 5.0 กรัม, yeast extract 20 มิลลิกรัมปรับ pH ให้เป็น 7.0 ถ้าเป็นอาหารกึ่งแข็งเติม Bacto agar 0.5 กรัมต่อลิตรและถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3.3 อาหารสำหรับทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Motility test medium) ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย beef extract 3 กรัม, peptone 10 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม, agar 4 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 8.3

2.3.4 Christensen's urea agar อาหารสำหรับทดสอบเอนไซม์ยูริเอส (urease) ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย peptone 1 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม, กลูโคส 1 กรัม, ยูเรีย 20กรัม, phenol red 0.012 กรัม, agar 15-20 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 6.8

2.3.5 Trypticase-nitrate broth อาหารสำหรับทดสอบ nitrate reduction test สารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย peptone 20 กรัม, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม, เด็กโตรส 1 กรัม, agar 1 กรัม, โปแตสเซียมไนเตรต 1 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.2

2.3.6 อาหารสำหรับทดสอบความต้องการไบโอติน สารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัม, กรดมาลิก 5.0 กรัม, เฟอรัสซัลเฟต 0.01 กรัม, โซเดียมโมลิบเดต 0.002 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 0.1 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ 0.026 กรัม, แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไบโอตินเป็นองค์ประกอบด้วยจะเติมไบโอตินลงไป 0.001 กรัมต่อลิตร

2.3.7 อาหารสำหรับทดสอบ Acidification of peptone-based glucose สารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย peptone 2.0 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัม, แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม, เฟอริคคลอไรด์ 0.002 กรัม, แมงกานีสซัลเฟต 0.002

กรัม, bromthymol blue 0.025 กรัม ทำให้เป็น 950 มิลลิลิตร เมื่อเย็นนำมาเติม กลูโคส 20 เปอร์เซนต์(w/v) 50 มิลลิลิตรซึ่งทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง

2.3.8 MPSS broth เป็น complex media ที่ใช้ในการศึกษารูปร่างของเซลล์ ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย peptone 5.0 กรัม, กรดซัคซินิค 1.0 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัม,แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0กรัม, เฟอริคคลอไรด์ 0.002 กรัม, แมงกานีสซัลเฟต 0.002 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.0ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์

2.3.9 อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทรานส์ฟอร์มโดยใช้ DMSO

2.3.9.1 SOB medium สารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย Bacto tryptone 2.0 กรัม, yeast extract 0.5 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 0.58 กรัม, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.19 กรัม, แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.03 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 2.46 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.0

2.3.9.2 SOC medium ได้แก่ SOB medium ที่เติม กลูโคส 20 มิลลิโมลาร์

2.3.9.3 LM medium สารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย Bacto tryptone 0.5 กรัม,โซเดียมคลอไรด์ 0.58 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 10 มิลลิโมลาร์, Bacto agar 15 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.0 สำหรับจานเพาะเชื้อที่ใส่เททระไซคลิน ไม่ต้องใส่แมกนีเซียมซัลเฟต

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 สารละลาย crystal violet 1 เปอร์เซนต์ ชั่ง crystal violet 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.4.2 สารละลาย Gram's iodine ชั่งไอโอดีน 1 กรัม,โปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.4.3 สารละลายSafranine ชั่ง safranine 0.25 กรัม ละลายในเอธานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

2.4.4 Oxidase reagent ชั่ง tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

015712

2.4.5 สารละลาย Sulfanilic acid 0.8 เปอร์เซนต์ ชั่ง sulfanilic acid (p-aminobenzene sulfonic acid) 8 กรัม ละลายในกรดอะซีติก 30 เปอร์เซนต์จนได้ปริมาตร 1 ลิตร

2.4.6 สารละลาย dimethyl-α-napthylamine 0.6 เปอร์เซนต์ ชั่ง dimethyl-α-napthylamine 6 กรัมละลายในกรดอะซีติก 30 เปอร์เซนต์ จนได้ปริมาตร 1 ลิตร

2.4.7 สารละลาย TE บัฟเฟอร์ (Maniatis, T., 1982) ใช้สำหรับละลายดีเอ็นเอประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

2.4.8 สารละลาย Tris-borate บัฟเฟอร์ (Maniatis, T., 1982) เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ทำอิเลคโทรโฟริซิสประกอบด้วย Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์, boric acid 89 มิลลิโมลาร์, EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ pH 8.3

2.4.9 Tracking dye (Maniatis, T., 1982) ใช้ผสมกับดีเอ็นเอก่อนทำอิเลคโทรโฟริซิสประกอบด้วย bromphenol blue 0.1 กรัม, ficoll 400 0.1 กรัม, EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์, SDS 1 กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร

2.4.10 สารละลาย FSB บัฟเฟอร์ (Transformation buffer for frozen storage of completent cell) ประกอบด้วยโปแตสเซียมอะซีเตต 10 มิลลิโมลาร์, โปแตสเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์, แมงกานีสคลอไรด์ 45 มิลลิโมลาร์, แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์, รูบิเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์, กลีเซอรอล 10 เปอร์เซนต์

2.4.11 สารละลาย Lowry (Lowry, O.H., 1951) ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีนประกอบด้วย

สารละลาย A : โซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B : คอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม, โซเดียมโปแตสเซียม-ตาร์เตต 1 กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร

เมื่อต้องการใช้ผสมสารละลาย A กับ สารละลาย B ด้วยอัตราส่วน A:B เท่ากับ 50:1

2.4.12 สารละลายสำหรับสกัดแยกพลาสมิด

2.4.12.1 สารละลายไลโซไซม์ ประกอบด้วย ไลโซไซม์ 0.2 เปอร์เซนต์(w/v), กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

2.4.12.2 lysis solution ประกอบด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม, SDS 1 กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร

2.5 การเก็บแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 การเก็บระยะสั้น

ก. plate nutrient agar มีอายุการเก็บประมาณ 1 เดือน ในกรณีที่ใช้เจริญ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBR322, pSA30 จะเสริมด้วยเททระไซคลิน 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงในอาหาร ส่วนการเจริญ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pCK3 จะเสริมด้วยคานาไมซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. slant nutrient agar ใช้สำหรับเก็บเชื้อทั่วไป บรรจุอยู่ในขวดขนาดเล็ก(vial) หลังจากปิดฝาแน่นแล้วชุบบริเวณฝาด้วยพาราฟินเหลว เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.5.2 การเก็บระยะยาว

เจริญแบคทีเรียในอาหารอุดม NB ในขวดขนาดเล็กจนถึงระยะล็อกเฟส แล้วเก็บเชื้อโดยการเติมกลีเซอรอลลงไปจนความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50เปอร์เซนต์ หลังปิดฝาขวดแน่นแล้วชุบบริเวณฝาด้วยพาราฟินเหลวก่อนนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.6 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

2.6.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculation)

เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีจากจานแม่ (master plate) ลงในอาหารอุดม NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ (erlenmayer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส สำหรับ *Azospirillum spp.* และที่ 37 องศาเซลเซียสสำหรับ *E. coli*

2.6.2 การเลี้ยงและวัดการเจริญของแบคทีเรีย

ใส่เชื้อตั้งต้นลงในน้ำเลี้ยงเชื้อ NB จำนวน 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาด 250 มิลลิลิตรด้วยอัตราส่วนของเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 6:100 ปิดจุกด้วยสำลี บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที วัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดแสงชนิด Spectronic 20

2.7 การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) สรีรวิทยา (physiology) และ ชีวเคมีของ *Azospirillum sp.*A$_{12}$

การศึกษาสัณฐานวิทยาทำดังข้อ 2.7.1,2.7.2,2.7.5 และ 2.7.13 การศึกษาสรีรวิทยาทำดังข้อ 2.7.3,2.7.4,2.7.9 จนถึง 2.7.12 และการศึกษาชีวเคมีทำดังข้อ 2.7.6, 2.7.7 และ 2.7.8

2.7.1 การย้อมแกรม (gram stain)

นำเชื้อที่เจริญในอาหารอุดม NB ระยะล็อกเฟสหยดลงบนสไลด์ 1 หยด ปล่อยให้แห้งแล้วตรึงโดยผ่านเปลวไฟไปมา 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้เย็น หยด 1 เปอร์เซนต์ crystal violet ให้ทั่วบริเวณที่ตรึงแบคทีเรียไว้ปล่อยทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปาแล้วหยด สารละลาย Gram's iodine ให้ท่วมบริเวณดังกล่าวปล่อยไว้อีก 1 นาที เทสารละลาย Gram's iodine ออกแล้วล้างทันทีด้วย 95เปอร์เซนต์เอธานอล ล้างต่อด้วยน้ำประปา จากนั้นย้อมทับด้วย safranin นาน 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ปล่อยให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า แบคทีเรียที่เป็นแกรมบวก (gram positive) จะติดสีน้ำเงิน ส่วนแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ (gram negative) จะติดสีแดง

2.7.2 รูปร่างของเซลล์ (shape)

การตรวจดูรูปร่างของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ทำได้ 2 วิธี คือ

2.7.2.1 ดูจากสไลด์ที่ย้อมแกรม (ข้อ 2.7.1)

2.7.2.2 หยดเชื้อที่เจริญในอาหารอุดมจนถึงระยะล็อกเฟสลงบนสไลด์ 1 หยด ปิดทับด้วยแผ่นแก้วบาง (cover slip) ก่อนนำไปตรวจดูรูปร่างของเซลล์

2.7.3 การเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

การตรวจการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียทำโดยวิธีการ 2 แบบคือ

2.7.3.1 Hanging drop method

หยดเชื้อที่เจริญในอาหารอุดม NB จนถึงระยะล็อกเฟส ค่อยๆคว่ำแผ่นแก้วนี้ลงบนสไลด์หลุม นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นการเคลื่อนที่แบบ vital movement ซึ่งมี flagella เป็นตัวช่วยในการเคลื่อนที่ หรือเป็น Brownian movement ที่เกิดจากการสั่นหรือการเคลื่อนไหวไปมาของอนุภาคเล็กๆซึ่งการเคลื่อนไหวนี้ไม่ได้เกิดจาก flagella

2.7.3.2 semisolid method

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก nutrient agar plate ที่อายุ 18-24 ชั่วโมง แทง(stab)ลงไปตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ให้ลึกประมาณ 1 นิ้ว ค่อยๆดึงเข็มออกมาตรงๆ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสประมาณ 24 ถึง 48 ชั่วโมง สังเกตดูการเจริญของแบคทีเรียว่ามีการเคลื่อนที่จากรอยแทงนั้นหรือไม่ ถ้าอาหารบริเวณรอบๆรอยแทงมีความขุ่นเพิ่มขึ้นแสดงว่ามีการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย แต่ถ้ามีความขุ่นเกิดขึ้นเฉพาะรอยแทงเท่านั้นแสดงว่าแบคทีเรียไม่มีการเคลื่อนที่

2.7.4 การตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

2.7.4.1 การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจน

นำเชื้อที่เจริญในอาหารอุดม NB จนถึงระยะล็อกเฟสมาปั่นเก็บเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจน 1 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนลงไป แล้วกระจายเซลล์ลงบนจานอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียนั้นๆบนจานอาหาร แบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าว แสดงว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้

2.7.4.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนส(nitrogenase) โดยวิธีอะเซทิลีนรีดัคชัน (acetylene reduction)

เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจิเนสสามารถรีดิวซ์อะเซทิลีน (acetylene) เป็นเอทิลีน (ethylene)ได้ดังนั้น จึงสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสได้จากปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นต่อหนึ่งหน่วยเวลา เมื่อใช้อะเซทิลีนเป็นสารตั้งต้น

ปั่นเก็บเซลล์ในระยะล็อกเฟสที่เจริญในอาหารอุดม ล้างเซลล์ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน 1 ครั้ง กระจายเซลล์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนปริมาตรเท่ากับเชื้อตั้งต้น จากนั้นเติมเชื้อที่เตรียมได้ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนในสภาพกึ่งแข็งด้วยอัตราส่วนเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 5:100 แบ่งคัลเจอร์ที่ได้ 5 มิลลิลิตรใส่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ที่มีขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสจนถึงเวลาที่ต้องการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จึงเปลี่ยนใช้จุกยาง ทำบรรยากาศในขวดทดลองให้มีอะเซทิลีน 10เปอร์เซนต์โดยใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศในขวดทดลองออก 3 มิลลิลิตร แล้วใส่ก๊าซอะเซทิลีนในจำนวนที่เท่ากันเข้าไปแทนที่ หลังจากบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำไปวัดก๊าซเอทิลีนที่เกิดจากการรีดิวซ์อะเซทิลีนโดยเอนไซม์ไนโตรจิเนส การวัดทำโดยฉีดก๊าซตัวอย่าง 200ไมโครลิตร เข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟที่มี detector ชนิด Flame ionization ใช้คอลัมน์parapak N ขนาด 2.0 ม.x 0.5 นิ้ว และมีไนโตรเจน(OFN) เป็นก๊าซพาด้วยความเร็ว 30 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 90 องศาเซลเซียส

ปริมาณก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้นคำนวนได้จากความสูงของยอด (peak) เอทิลีนตัวอย่างเปรียบเทียบกับความสูงของยอดเอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry แอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดัคชัน แสดงค่าเป็นไมโครโมลของเอทิลีนที่เกิดขึ้นต่อมิลลิกรัมโปรตีนของแบคทีเรียต่อชั่วโมง

2.7.5 <u>การตรวจลักษณะและสีของโคโลนี</u>

2.7.5.1 ตรวจดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน และดูสีของโคโลนีที่อายุมาก

2.7.5.2 ตรวจดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ NB ดูสีของโคโลนีที่มีอายุมาก

2.7.6 <u>การตรวจหาเอนไซม์ออกซิเดส</u> (oxidase)

การตรวจหาเอนไซม์ออกซิเดสในแบคทีเรียทำได้ 2 วิธี คือ

2.7.6.1 <u>Indirect paper procedure</u>

วางกระดาษกรองลงใน petridish หยด oxidase reagent ลงบนกระดาษกรองให้พอชื้น ใช้loopเขี่ยป้ายลงบนบริเวณกระดาษกรองที่หยด

oxidase reagent โดยลากให้เป็นเส้นยาวประมาณ 3 เซนติเมตร สังเกตการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายลงไปบนกระดาษกรอง ถ้าแบคทีเรียมีเอนไซม์ออกซิเดสเชื้อที่ป้ายลงไปจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที แต่ถ้าไม่มีเอนไซม์ออกซิเดสเชื้อจะไม่เปลี่ยนสี

2.7.6.2 Direct plate procedure

ขีดเชื้อบนจานเลี้ยงเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆหยด oxidase reagent 2-3 หยด ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ สังเกตการเปลี่ยนสีของโคโลนี ถ้ามีเอนไซม์ออกซิเดส โคโลนีจะไม่เปลี่ยนสีหรือเป็นสีชมพูอ่อนซึ่งเป็นสีของ reagent

2.7.7 การตรวจหาเอนไซม์ยูริเอส (urease)

ทำโดยเพาะเชื้อลงบนผิวหน้าของ Christensen's urea agar slant (heavy inoculation) นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงแสดงว่ามีเอนไซม์ยูริเอส ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 พวก ดังนี้

ก. rapid positive อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงภายใน 1-6 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ให้ผลเช่นนี้ ได้แก่ *Proteus spp.*

ข. Delayed positive อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงใช้เวลาตั้งแต่ 6-24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ให้ผลเช่นนี้ เช่น *Klbsiella spp.*, *Aerobacter spp.* *Citobacter spp* และ *Brucella spp.* ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าแบคทีเรียไม่มีเอนไซม์ยูริเอส

2.7.8 การตรวจหาเอนไซม์คะตะเลส (catalase)

เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสสามารถเปลี่ยน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปเป็นก๊าซ O_2 และ H_2O ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

ดังนั้นสามารถตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลสได้โดยดูจากฟองก๊าซ O_2 ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ H_2O_2 เป็นสารตั้งต้น ซึ่งการตรวจสอบทำได้ 2 วิธี คือ

2.7.8.1 Slide method

ใช้ loop แตะเชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด ใช้ dropper ดูด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ หยดลงบนเชื้อที่แตะไว้บน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สไลด์ 1 หยด ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่ามีเอนไซม์คะตะเลส แต่ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียไม่มีเอนไซม์นี้

2.7.8.2 Tube method

เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซนต์ ลงใน agar slant culture หลอดละ 1มิลลิลิตร สังเกตดูว่ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นหรือไม่ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่ามีเอนไซม์คะตะเลส ถ้าไม่มีฟองก๊าซแสดงว่าไม่มีเอนไซม์นี้

2.7.9 การทดสอบ Nitrate Reduction

เพาะเชื้อลงใน trypticase - nitrate broth ทำหลอดควบคุม โดยใช้ trypticase - nitrate broth ที่ไม่ได้เพาะเชื้อใดๆไว้ เอาหลอดเพาะเชื้อและหลอดควบคุมไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำแต่ละหลอดมาเติมสารละลาย sulfanilic acid 1 มิลลิลิตรและเติม สารละลาย dimethyl-alpha-napthylamine 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ดูการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่ามีไนไตรต์อยู่ นั่นคือไนเตรตถูกแบคทีเรียรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์ ถ้าไม่มีสียังสรุปไม่ได้เพราะอาจเป็นไปได้ว่าไนเตรตไม่ถูกรีดิวซ์ หรือว่าอาจจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์แล้วไนไตรต์ถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นแอมโมเนียหรือ ก๊าซไนโตรเจน ดังนั้นในกรณีนี้ต้องทำการทดสอบต่อโดยเติม zinc dust ประมาณ 20 มิลลิกรัม เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่ามีไนเตรตอยู่และไนเตรตถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์โดย zinc dust ก็จัดเป็น negative nitrate reduction แต่ถ้าเติม zinc dust แล้วไม่มีสี แสดงว่าไม่มีไนเตรตเหลืออยู่ จัดเป็น positive nitrate reduction

2.7.10 การทดสอบความต้องการไบโอติน (biotin requirement)

ปั่นเก็บเชื้อตั้งต้นที่เจริญใน NB 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นแล้วกระจายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจนได้ความขุ่นของเซลล์ประมาณ 20 Klett unit ถ่ายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ที่มีขนาดความจุ 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสำหรับทดสอบความต้องการไบโอตินที่มีหรือไม่มีไบโอตินอยู่ 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ถ้ามีการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่ไม่มีไบโอติน ให้ถ่ายเชื้อจากขวดนี้ไปยังขวดทดลองที่ใส่อาหารที่มีหรือไม่มีไบโอตินอีกครั้งหนึ่ง นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ดูการเจริญของแบคทีเรียในขวดทดลองทั้งสอง ถ้าเชื้อ

เจริญได้ในขวดทดลองที่ไม่มีไบโอตินแสดงว่าเชื้อไม่ต้องการไบโอตินในการเจริญ แต่ถ้าเชื้อเจริญในขวดทดลองที่ไม่มีไบโอตินไม่ได้แสดงว่าเชื้อต้องการไบโอตินในการเจริญ

2.7.11 <u>การทดสอบการผลิตกรดเมื่อเจริญใน peptone-based glucose (Acidification of peptone base glucose medium)</u>

เพาะเชื้อที่เจริญในอาหารอุดมจนถึงระยะล็อกเฟส จำนวน 1 loop ลงใน peptone-based glucose medium 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 96 ชั่วโมง ถ้ามี acidification เกิดขึ้นอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีเหลือง

2.7.12 <u>การทดสอบการใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน</u>

เพาะเชื้อที่เจริญในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนที่ใช้มาเลท (malate) เป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในสภาพกึ่งแข็ง จำนวน 1 loop ลงในขวดทดลองที่บรรจุอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนที่ใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน (กลูโคส 1เปอร์เซนต์) 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าเจริญได้แสดงว่าใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนได้ ถ้าเจริญไม่ได้แสดงว่าใช้กลูโคสเป็นต้นตอของคาร์บอนในสภาวะนี้ไม่ได้

2.7.13 <u>การตรวจรูปร่างลักษณะของเซลล์ในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจนแตกต่างกัน</u>

เพาะเชื้อที่เจริญในอาหารอุดม NB จนถึงระยะล็อกเฟส จำนวน 1 loop ลงใน MPSS broth 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปตรวจดูรูปร่างของเซลล์ดังข้อ 2.7.2 เปรียบเทียบกับรูปร่างของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเชื้อที่เจริญในอาหารอุดมจนถึงระยะล็อกเฟสจำนวน 1 loop ลงในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน MPPS broth *Azospirillum* ทุกสายพันธ์จะมีรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.0ไมโครเมตร ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน *A. lipoferum* จะมีรูปร่างหลายชนิดเป็นรูป S shape หรือ helical shape และมีขนาดประมาณ 1.4-1.7 x 5-30 ไมโครเมตร ขณะที่

A. brasilense จะมีรูปร่างเป็น vibrioid form

2.8 <u>การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกขณะอิเลคโทรโฟริซิส</u>

(Eckhardt,T.,1978)

หลักการของการทดลองนี้คือ ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกขณะที่ทำอิเลคโทรโฟริซิสโดยใช้ SDS และไลโซไซม์ เมื่อเซลล์แตกแล้วพลาสมิดและโครโมโซมจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าโดยอัตราในการเคลื่อนจะแปรผันตามขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ

เขี่ยโคโลนีของเชื้อใส่ในสารละลายที่ประกอบด้วย ซูโครส 10 เปอร์เซนต์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์, Tris- HCl 25 มิลลิโมลาร์, pH 8.0 ,ไลโซไซม์ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase 8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในหลุมล่างของแผ่นอะกาโรลเจลความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ซึ่งเตรียมในสารละลาย Tris-borate บัฟเฟอร์ (Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์, กรดบอริค 89 มิลลิโมลาร์ , EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ , pH 8.3) หยอดสารละลายของ ซูโครส 5 เปอร์เซนต์ และ SDS 8 เปอร์เซนต์ จำนวน 40 ไมโครลิตร ลงในหลุมด้านบนของเจล ทำอิเลคโทรโฟริซิส 15 โวลท์ นาน 1ชั่วโมง เพื่อให้สารละลาย SDS เคลื่อนลงมาทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกเป็นเหตุให้พลาสมิดและโครโมโซมหลุดออกจากเซลล์ เปลี่ยนความต่างศักย์เป็น 80 โวลท์ นาน 3 ชั่วโมง 30 นาที นำเจลมาย้อมโดยแช่ใน ethidium bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 1 ชั่วโมงนำเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจากU.V. Transilluminator และบันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มไวแสงชนิด Tri-X pan 400 (Kodax) โดยใช้แผ่นกรองแสงสีแดง

2.9 <u>การตรวจสอบระดับยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย</u>

เพาะเชื้อในอาหารอุดมข้ามคืน ทำ serial dilution จนได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^{3}-10^{4} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดมา 0.1 มิลลิลิตร กระจายลงบนจานเลี้ยงเชื้ออาหารอุดม NB ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆในระดับความเข้มข้นต่างกัน ดูระดับยาปฏิชีวนะต่ำสุดที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

2.10 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry ,O.H , 1951)

ผสมสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรกับสารละลาย Lowry (โซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซนต์, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซนต์ : คอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซนต์, โซเดียมโปแตสเซียมอะซีเตต 1 เปอร์เซนต์ เท่ากับ 50:1) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย Folin ciocalten (phenol 50 เปอร์เซนต์) ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของอัลบูมินจากซีรัมวัว (Bovin serum albumin)

2.11 การสกัดและเก็บรักษาพลาสมิดดีเอ็นเอ

เครื่องใช้ทุกชนิดต้องสะอาดและปราศจากเอนไซม์นิวคลิเอส

2.11.1 วิธีเลี้ยงเชื้อและเพิ่มปริมาณพลาสมิดในเซลล์

ก. เชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pCK3

เจริญเชื้อในอาหารอุดมที่มีคานาไมซิน 50ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส จนเข้าสู่การเจริญในระยะสเตชันเนอริเฟสตอนต้น ซึ่งมีค่า OD_{550} ประมาณ 0.8-1.0

ข. เชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pSA30

เจริญเชื้อในอาหารอุดมที่มีเททระไซคลิน 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส จนเข้าสู่การเจริญในระยะสเตชันเนอริเฟสตอนต้น ค่า OD_{550} ประมาณ 0.8-1.0

ค. เชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBR322

เจริญเชื้อในอาหารอุดมที่มีเททระไซคลิน 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส จนถึงการเจริญในระยะล็อกเฟสโดยมีค่า OD_{550} ประมาณ 0.4-0.5 จากนั้นเพิ่มปริมาณพลาสมิดในเซลล์ โดยเติมคลอแรมฟินิคอล จนความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 170 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่37 องศาเซลเซียส จนได้เซลล์ในระยะสเตชันเนอรีเฟสตอนต้น ค่า OD_{550} ประมาณ 0.8-1.0

หลังเจริญเชื้อต่างๆตามข้อก.,ข.และ ค.แล้วจึงปั่นเก็บเซลล์ 50 มิลลิลิตรที่ 4000xg ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำไปแยกพลาสมิดต่อไป

2.11.2 <u>วิธีแยกพลาสมิด</u> (Birnboim, H.C. และ Doly, J., 1979)

นำตะกอนเซลล์มาเติมสารละลายไลโซไซม์ (ไลโซไซม์ 0.2 เปอร์เซนต์ (w/v) ,กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์,Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ , pH 8.0) 2 มิลลิลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที เติม lysis solution (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซนต์, SDS 1 เปอร์เซนต์) 4 มิลลิลิตร กลับหลอดขึ้นลงเบาๆ บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที เพื่อทำให้ผนังเซลล์เป็นรูรั่วและดีเอ็นเอออกมาเกิดการdenature ในสารละลายด่างเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตต 3 โมลาร์ pH 4.8 จำนวน 3 มิลลิลิตร เพื่อ neutralized พลาสมิดจะ renatureได้ง่ายเนื่องจากมีขนาดเล็กเมื่อแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 60 นาที โปรตีน โครโมโซม และอาร์เอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะตกตะกอน นำมาปั่นที่ 20,000 xg 20 นาที นำส่วนลอยมาเติมแอบโซลูทเอธานอลที่เย็นลงไป 2 เท่าของปริมาตรส่วนลอย ตั้งไว้ที่ -20องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 xg 10 นาที เทส่วนลอยทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ (EDTA 1 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ , pH 8.0) 3 มิลลิลิตร ปรับสารละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.2 โมลาร์โดยเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ แบ่งสารละลายดีเอ็นเอใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติม แอบโซลูทเอธานอลที่เย็นลงไป 2 เท่าของปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่มีอยู่ ตั้งไว้ที่-20องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ปั่นด้วยความเร็ว 12,000xg นาน5 นาที เทส่วนลอยทิ้งไป ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ จำนวน 500 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.11.3 <u>การเก็บรักษาพลาสมิดดีเอ็นเอ</u>

สารละลายและภาชนะที่ใช้เก็บดีเอ็นเอ ต้องปราศจากนิวคลิเอส การเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 วิธี

ก. การเก็บรักษาระยะสั้นภายในเวลาประมาณ 2 เดือน ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE บัฟเฟอร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข. การเก็บรักษาระยะเวลานานกว่า 2 เดือน เก็บในรูปตะกอนในแอบโซลูทเอธานอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้นำมาปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอละลายในสารละลาย TE บัฟเฟอร์

2.12 <u>การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโทรโฟริซิส</u> (Maniatis,T.,1982)

การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอทำโดยใช้อะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ซึ่งเตรียมในสารละลาย Tris borate (Tris-HCl 89 มิลลิโมลาร์, กรดบอริก 89 มิลลิโมลาร์, EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ , pH 8.3) และใส่ดีเอ็นเอประมาณ 200-400 นาโนกรัมต่อ 1 ช่องของเจล ถ้าเจลมีขนาด 110x60x3 มิลลิเมตรทำอิเลคโทรโฟริซิส 50 โวลท์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที และถ้าเจลมีขนาด 100x80x8มิลลิเมตร ทำอิเลคโทรโฟริซิส นาน 3 ชั่วโมง 30 นาที ในสารละลายTris-borate บัฟเฟอร์ โดยให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกและใช้ tracking dye เป็นเครื่องหมาย

2.13 <u>วิธีการทรานส์ฟอร์ม</u>

2.13.1 <u>การทรานส์ฟอร์มพลาสมิดโดยการใช้แคลเซียมคลอไรด์</u>

(Dagert,H.และ Ehrich,S.D.,1979)

เพาะเชื้อตั้งต้นจำนวน 2 มิลลิลิตรลงในน้ำเลี้ยงเชื้อ NB 60 มิลลิลิตร เลี้ยงโดยเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียสจนเซลล์เจริญถึงระยะล็อกเฟส ค่า OD_{560} ประมาณ 0.4-0.5 แช่ขวดทดลองเลี้ยงเชื้อในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาทีเก็บเซลล์โดยการปั่นที่ 2,000xg 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ในหลอดปั่นที่ได้รับการแช่เย็นมาก่อน เทส่วนลอยทิ้ง แช่เซลล์ในน้ำแข็งเติม Tris-HCl, pH 8.0 10 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ ที่เย็นจำนวน 25 มิลลิลิตร ค่อยๆเขย่าจนเซลล์กระจายทั่ว ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งอีก 5 นาที ปั่นเก็บเซลล์ที่ 2,000xg 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เติม Tris-HCl pH 8.0 10 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ ที่เย็นลงไป 4 มิลลิลิตร ค่อยๆเขย่าจนเซลล์กระจายทั่ว ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งอีก 20 ชั่วโมง

แบ่งคอมพีเทนต์เซลล์ที่ได้ใส่หลอดทดลองที่แช่เย็นไว้หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เติมพลาสมิดจาก ข้อ 2.11 ซึ่งมีปริมาตรไม่เกิน 100 ไมโครลิตรลงไป ตั้งในน้ำแข็ง 30 นาที เพิ่มอุณหภูมิอย่างกระทันหัน (heat shock) โดยอุ่นส่วนผสมในหลอดทดลองที่ 42 องศาเซลเซียส 2 นาที นำหลอดทดลองแช่ในน้ำแข็งทันที 1 นาที จึงเติม NB ลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง กระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

ก. จานเลี้ยงเชื้อควบคุม (control plate) โดยเจือจางเชื้อซึ่งไม่ได้ใส่พลาสมิดให้เป็น $1/10^4$ และ $1/10^5$ ก่อนกระจาย 0.1 มิลลิลิตรของเชื้อที่เจือจางลงไป

ข. จานเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดทรานส์ฟอร์แมนท์ (selected plate) ที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pCK3 โดยกระจาย 0.1 มิลลิลิตรของเชื้อ ที่ทำการทรานส์ฟอร์มลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ผสมคานาไมซิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. จานเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้จากการทรานส์ฟอร์มด้วย pBR322, pSA30 ทำโดยกระจาย 0.1 มิลลิลิตรของเชื้อที่ทำการทรานส์ฟอร์มลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ผสมเททระไซคลิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บ่มจานเพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส 2 วัน นับจำนวนโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อควบคุมและจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดทรานส์ฟอร์แมนท์ คำนวนประสิทธิภาพการทรานส์ฟอร์มจาก

ประสิทธิภาพในการทรานส์ฟอร์ม = จำนวนทรานส์ฟอร์แมนท์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ

2.13.2 Deoxyribonucleic Acid-Mediated Transformation (Mishra,A.K.,1979)

เจริญเชื้อตั้งต้น 1 มิลลิลิตร ในอาหารอุดม NB 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง แบ่งเชื้อดังกล่าวมา 5 มิลลิลิตรเติมพลาสมิดดีเอ็นเอ (จากข้อ 2.11) 0.1 มิลลิลิตร (ประมาณ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมงกระจายแบคทีเรียบนจานเลี้ยงเชื้อควบคุมและจานเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดทรานส์ฟอร์แมนท์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2 วัน จึงนับจำนวนโคโลนีที่สามารถเจริญได้เพื่อคำนวนประสิทธิภาพของการทรานส์ฟอร์ม

2.13.3 การทรานส์ฟอร์มโดยใช้ DMSO (Fani,R.,1986)

เจริญเชื้อตั้งต้น 1 มิลลิลิตร ลงใน SOB medium 30 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียสจนได้ค่าความขุ่นของเซลล์ OD_{560} เป็น 0.45-0.55 ถ่ายเชื้อใส่หลอดปั่น แช่ในน้ำแข็ง 10-15 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 2,000 xg 4 องศาเซลเซียส 10 นาที กระจายเซลล์ในสารละลาย FSB 2.4 มิลลิลิตร เติม DMSO 70 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติม DMSO อีก 70 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที แบ่งคอมพลีเทนต์เซลล์ใส่หลอดแก้วที่แช่เย็นมาแล้วหลอดละ 210 ไมโครลิตร นำไปทำให้แข็งอย่างเฉียบพลันโดยแช่ในน้ำแข็งแห้งที่เติมเอธานอล นำเซลล์ไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทรานส์ฟอร์ม เมื่อใช้นำมาละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมดจึงนำไปตั้งในน้ำแข็ง 30 นาที เติมพลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 2.11 ปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน ตั้งในน้ำแข็ง 60 นาทีจุ่มในอ่างน้ำอุ่น 42 องศาเซลเซียส 2 นาที นำกลับมาตั้งในน้ำแข็ง 1 นาที เติมน้ำเลี้ยงเชื้อ SOC 800 ไมโครลิตร แล้วเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กระจายเชื้อบนจานเลี้ยงเชื้อควบคุม LM plate และบนจานเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดทรานส์ฟอร์แมนท์ LM plate ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเพื่อคำนวนประสิทธิภาพการทรานส์ฟอร์ม

2.14 การเตรียม cell free extract

เจริญเชื้อตั้งต้น 6 มิลลิลิตร ในอาหารอุดม NB 200 มิลลิลิตร เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส จนถึงระยะสเตชันเนอริเฟส ใช้เวลาประมาณ 15ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ที่ 5,000 xg 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เทส่วนลอยทิ้งกระจายตะกอนเซลล์ด้วย extract buffer (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ ,2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์ ,pH 7.5) 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำลายเซลล์โดยใช้เสียงความถี่สูง (sonicator) ปั่นแยกเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 4,000 xg 4 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บส่วนลอย คือ สารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำไปตรวจสอบเรสทริกชันเอนไซม์ , nonspecific endonuclease หรือนำไปทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

2.15 การวิเคราะห์เรสทริกชันเอนไซม์ (restriction endonuclease assay)

บ่ม cell free extract หรือสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น กับดีเอ็นเอ 200-400 นาโนกรัม ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในสารละลายปฏิกริยา (reaction mixture) 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, แมกนีเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์, dithiothreitol 1 มิลลิโมลาร์ ในกรณีของเอนไซม์ class II ที่ต้องการบัฟเฟอร์ที่มีความแรงอิออนต่ำ (low ionic strength) สำหรับเอนไซม์ที่ต้องการความแรงอิออนปานกลาง (medium ionic strength) และ ความแรงอิออนสูง (high ionic strength) เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ในกรณีของเอนไซม์ class I และ III เติม ATP และ S-adnosylmethionine ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเติม tracking dye จำนวน 7 ไมโครลิตร ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลงโดยทำอิเลคโทรโฟริซิส

2.16 การตรวจหา non specific endonuclease

บ่ม cell free extract หรือ สารละลายเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นกับดีเอ็นเอในสารละลายปฏิกริยา 20 ไมโครลิตร ที่มี Tris-HCl pH 7.5 10 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาโดยบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไปทำอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อตรวจดูความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ลดลง

2.17 การตรวจดูระยะของเซลล์ที่เหมาะสมในการผลิตเรสทริกชันเอนไซม์

เนื่องจาก non specific endonuclease สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นสับสเตรทได้ซึ่งทำให้มีผลกระทบต่อการตรวจสอบเรสทริกชันเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องตรวจดูระยะของเซลล์ที่ผลิตเรสทริกชันเอนไซม์สูงขณะที่ผลิต non specific endonuclease ในปริมาณต่ำ

ใส่เชื้อตั้งต้นลงในอาหารอุตม NB ด้วยอัตราส่วนระหว่างเชื้อกับอาหารเท่ากับ 6:100 โดยอาหาร 200 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาด 1 ลิตร นำไปเขย่า

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ 30 องศาเซลเซียส จนถึงช่วงเวลาต่างๆ ปั่นเก็บเซลล์ที่ 5,000xg 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย extract buffer กระจายเซลล์ใน extract buffer 10 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำลายเซลล์ด้วยเสียงความถี่สูง นำไปปั่นแยกเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 40,000xg 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บส่วนลอยไปตรวจหาเรสทริกชันเอนไซม์และ non specific endonuclease

2.18 วิธีทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น (ทุกขั้นตอนทำที่ 7 องศาเซลเซียส)

2.18.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ทำการทดลองโดยเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตทีบดละเอียดลงใน cell free extract อย่างช้าๆพร้อมทั้งคนเบาๆโดยค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อย จนได้แฟรคชันละ 10 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นคนต่อไปอีก 15 นาที นำไปปั่นแยกตะกอนและส่วนลอยด้วยความเร็ว 5,000xg 4 องศาเซลเซียส 20 นาที จนได้สารละลายที่มีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 80 เปอร์เซนต์ ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ของแต่ละแฟรคชันด้วย extract buffer ตรวจหาเรสทริกชันเอนไซม์และ non spesific endonuclease ในแต่ละแฟรคชัน

2.18.2 การทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส (Phosphocellulose P11)

2.18.2.1 การเตรียมคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส

แช่ฟอสโฟเซลลูโลสในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ คนให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เทเอาส่วนน้ำใสออก ล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH ต่ำกว่า 11.0 จึงนำไปล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เทเอาส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH สูงกว่า 3.0 แล้วกระจายในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 100 มิลลิโมลาร์ ติเตรตด้วยไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจนได้ pH เท่ากับ 7.5 เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างด้วย elution buffer (โปแตสเซียมฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์) จนได้ pH และความนำไฟฟ้าเท่ากับ elution buffer จากนั้นนำมาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 2.5 x 21 เซนติเมตร ผ่านบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์อีก 3-4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ด้วยอัตราไหล 30

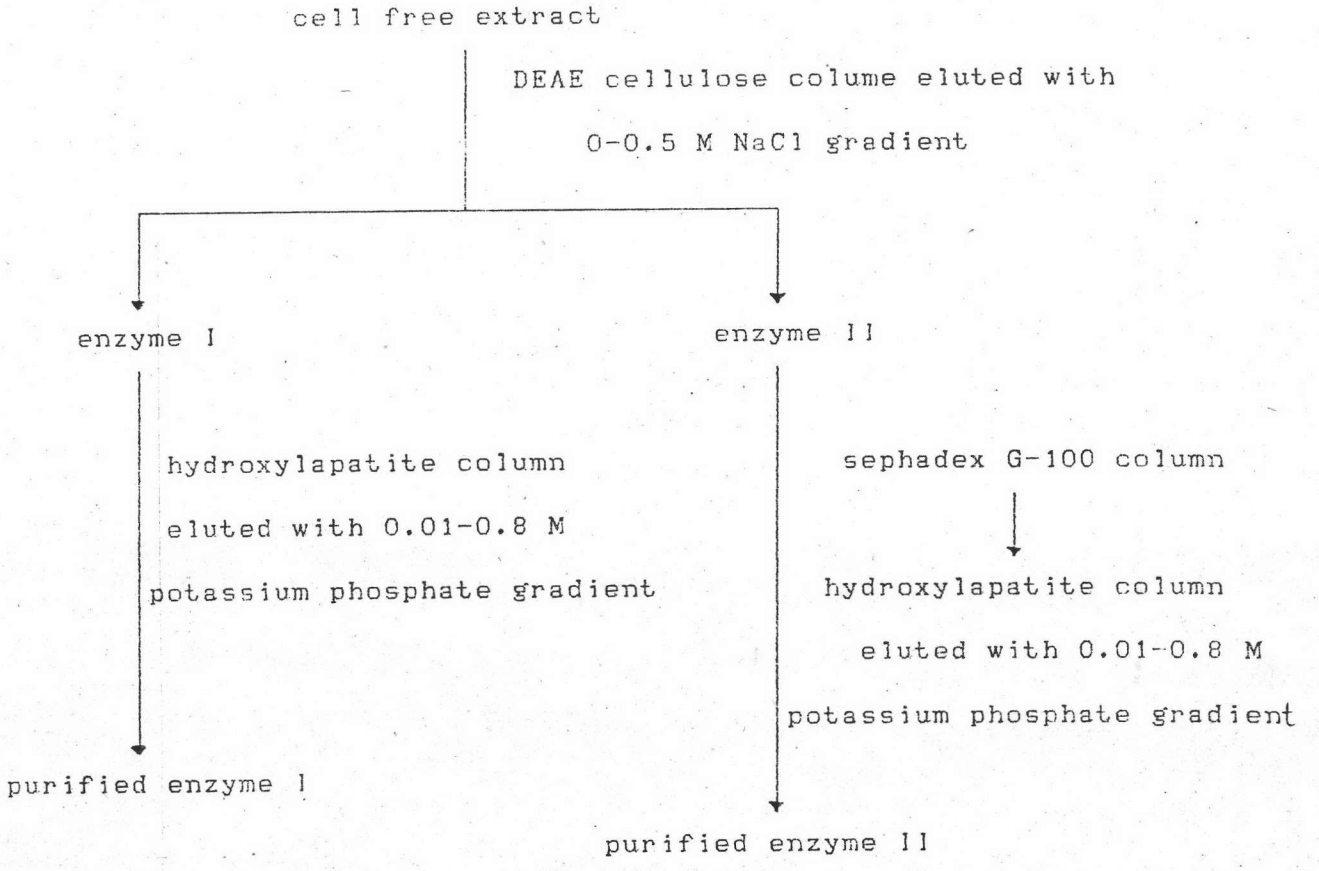
มิลลิลิตรต่อชั่วโมงเพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์

2.18.2.2 การใช้คอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส โดยวิธีชะด้วย Linear salt gradient elution

นำ cell free extract เติมลงในคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลส แล้วชะด้วย elution buffer จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีก (วัดค่า OD_{280} ได้เท่ากับ 0) จึงเปลี่ยนชะด้วย linear salt gradient ที่เป็นส่วนผสมของ elution buffer 350 มิลลิลิตรกับ elution buffer ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ปริมาณ 350 มิลลิลิตร เก็บแยกส่วนละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายทุกหลอดมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยการวัดความนำไฟฟ้าในสารละลาย

2.19 วิธีการและขั้นตอนการทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น

การทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นทำตามขั้นตอนดังแสดงในแผนภาพต่อไปนี้



2.19.1 การทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส (DEAE cellulose)

2.19.1.1 การเตรียมคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส

ล้างดีอีเออีเซลลูโลสด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH สูงกว่า 3.0 แล้วจึงล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ 1 ครั้ง ล้างต่อด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH ต่ำกว่า 11.0 เปลี่ยนเป็นล้างด้วย Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 100 มิลลิโมลาร์ 3-4 ครั้งแล้วล้างต่อด้วย elution buffer (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์) จนน้ำล้างมี pH และค่าความนำไฟฟ้า

ใกล้เคียงกับบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง จากนั้นนำมาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 1.7 x 30 เซนติเมตร ผ่าน elution buffer ลงไปในคอลัมน์ อีก 3-5เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์พร้อมทั้งวัด pH และค่าความนำไฟฟ้าของสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์จนได้เท่ากับบัฟเฟอร์ที่ใช้ผ่านคอลัมน์

2.19.1.2 การใช้คอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสโดยวิธีชะด้วย linear salt gradient elution

นำ cell free extract เติมลงในคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส แล้วชะด้วย elution buffer ประมาณ 400 มิลลิลิตร จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีก (วัดค่า OD_{280} เท่ากับ 0) จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient ที่เป็นส่วนผสมของ elution buffer 250 มิลลิลิตรและ elution buffer ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ 250 มิลลิลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดย Lowry's method และวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยการวัดค่าความนำไฟฟ้าของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลาย นำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์มารวมกันเพื่อที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100 (Sephadex G-100)

2.19.2 การทำให้เรสทริกชันเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100

2.19.2.1 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100

แช่เซฟาเด็กซ์จี-100 ในน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ ระหว่างต้มคอยคนเบาๆเพื่อไล่ฟองอากาศ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ล้างเจลด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ 2 ครั้ง แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วตรงขนาด 1.7 x 49 เซนติเมตร ผ่านบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเดกซ์จี-100 นี้อีก 3-4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์โดยการผ่านสารละลายบลูเดกซ์แทรนเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และโปแตสเซียมไดโครเมต

2.19.2.2 การใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-100

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส มาทำให้มีปริมาตรลดลงโดย utrafiltration เติมสารละลายเอนไซม์ (ปริมาตรไม่เกิน 2เปอร์เซนต์ของปริมาตรคอลัมน์) ลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-100 แล้วชะด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry พร้อมทั้งวัดแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์ รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกัน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (hydroxylapatite)

2.19.3 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

2.19.3.1 การเตรียมคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์

แช่ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ใน elution buffer (โปแตสเซียมฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์) คนให้ทั่วทิ้งให้ตกมารวมกันที่ก้นบิกเกอร์ เทผงละเอียดที่แขวนลอยอยู่ในบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำมาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วตรงขนาด 1.3 x 10 เซนติเมตร ผ่านบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ 3-4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราไหล 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงเพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์

2.19.3.2 การใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์โดยวิธีชะด้วย linear salt gradient elution

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาแล้วไดอะไลซ์ใน elution buffer จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วย elution buffer จนกระทั่งไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีก จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient ซึ่งเป็นส่วนผสมของสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์ 25 มิลลิลิตร และสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟต 0.8 โมลาร์ pH 7.5, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์ 25 มิลลิลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และวัดแอคติวิตีของ

T175139

เอนไซม์ รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์โดยการวัดความนำไฟฟ้าในสารละลายนำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเรสทริกชันเอนไซม์มาเก็บรวมกัน

2.20 การเก็บเรสทริกชันเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ไปไดอะไลซ์ในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, EDTA 1 มิลลิโมลาร์, 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 10 มิลลิโมลาร์, โซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์, กลีเซอรอล 50เปอร์เซนต์ สารละลายเอนไซม์จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า เก็บสารละลายเอนไซม์ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.21 การศึกษาสมบัติของเรสทริกชันเอนไซม์

2.21.1 การหาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.20 โดยวิธีตามข้อ 2.15 ในสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, แมกนีเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์, dithiothreitol 1 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0, 50 และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

2.21.2 การหา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.20 โดยวิธีตามข้อ 2.15ในสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์, dithiothreitol 1 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ตามลำดับ

2.21.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.20 โดยวิธีตามข้อ 2.15 ที่อุณหภูมิ 30, 37, 42, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.21.4 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.20 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และ dithiothreitol 10 มิลลิโมลาร์ ที่ pH ต่างๆกันคือ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อบัฟเฟอร์เป็น 1:1 โดยปริมาตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามข้อ 2.13

2.21.5 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.20 ที่อุณหภูมิ 30, 37, 42, 50, 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที แล้วนำมาตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามข้อ 2.13