# บทที่ 2

## อุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. 1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environmental incubator shaker.) เขย่าแบบโรตารี่ ของบริษัท New Brunswick scientific Co., USA.)

1. 2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ ( Water bath shaker ) รุ่น 1068 เขย่าแบบรีซิโปรคอล ของบริษัท Gesellschaft fur labortechnik (GEL) , Germany

1. 3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

1. 3. 1 เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge ) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman , USA.

1. 3. 2 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota , Japan.

1. 4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น UV160A ของบริษัท Shimadzu , Japan.

1. 5 เครื่องให้กำเนิดแสงอุลตร้าไวโอเลต ( UV-Transluminator) รุ่น FOTO/PREPI ของบริษัท Fotodyne , USA.

1. 6 ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ( Agarose gel electrophoresis equipment) ของบริษัท Mupid , Japan.

1. 7 ชุดเครื่องมือทำเจลอิเลคโตโฟริซิสแบบแผ่น ( Slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini Protein Dual Slab Cell ของบริษัท Biorad , USA.

1. 8 เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Sonicator) รุ่น W-385 ของบริษัท Heat systems ultrasonics Inc.,USA.

1. 9 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

-กล้องถ่ายภาพรุ่น FM-2 ของบริษัท Nikon , Japan.

-แผ่นกรองแสงสีแดง

-ฟิล์ม ขาว-ดำ ความไวแสง 400 (ASA400)

1 .10 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ( Incubator ) ของบริษัท Memmert , Germany

1. 11 ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow ของ ISSCO รุ่น BV-124 ของบริษัทอินเตอร์เนชั่นแนล ไซแอนทิฟิก ซัพพลาย จำกัด กรุงเทพ

1. 12 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) รุ่น FO535 ของบริษัท Sanyo electric Co.,Ltd , Japan.

1. 13 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำอุณหภูมิ -70 ° ซ. ของบริษัท Forma Scientific,USA.

1. 14 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) ของบริษัท Kokusan ,Japan.

1. 15 เครื่องชั่งรุ่น L2200p และ A200S ของบริษัท Sartorius , Germany.

1. 16 ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum oven ) ของบริษัท Hotpack carp.,USA.

1. 17 ชุดเครื่องกรองเซล(Vacuum fitration equipment) รุ่นSampling manifold 122 S ของบริษัท Millipore Cooporation., USA.

1. 18 แผ่นกรอง (Millipore membrane) ชนิด HA ขนาดรูพรุน 0. 45 ไมครอน ของบริษัท Millipore Cooporation., USA.

1. 19 ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเซลล์ (Prep-A-Gene) ของบริษัท Biorad , Japan.

2. เคมีภัณฑ์

2. 1 เรสตริกชั่นเอนไซม์และเอนไซม์ที่ใช้การโคลนยีนของบริษัท New England Biolabs , Inc., USA. ; BRL Inc., USA ; Amercham ,Inc., USA และ Toyobo, Inc., Japan.

2. 2 ไลโซไซม์(Lysozyme) ของบริษัท Sigma ,USA.

2. 3 ไรโบนิวคลีเอส (RNase) ของบริษัท Sigma ,USA.

2. 4 TES ของบริษัท Sigma ,USA.

2. 5 เฟนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์(phenylmetylsulfonyl fluoride) ของ Sigma chemical Co. , USA.

2. 6 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ( Sodium dodecyl sulphate) ของ BDH Chemical ., England.

2. 7 ฟลูออโรไดไนโตรเบนซีน(Fluorodinitrobenzene) ของ E. Merck , Germany

2. 8 โซเดียมคาร์บอเนต(Sodium carbonate) ของ E. Merck , Germany.

2. 9 โปแตสเซียมไซยาไนด์(Potassium cyanine) .ของ E. Merck , Germany

2. 10 เฟอริกแอมโมเนียมซัลเฟต(Ferric amonium sulphate) ของ E. Merck , Germany

2. 11 โพลีเอธิลีนไกลคอล(Polyethelene glycol) ของ Nacalai tesque Inc., Japan

เคมีภัณฑ์อื่นๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์(Analytical reagent grade)

3. เชื้อจุลินทรีย์และพลาสมิด

3. 1 *Bacillus subtilis* 168 จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซาก้า วิทยาเขต Suita ประเทศญี่ปุ่น

3. 2 *Escherichia coli* JM109 จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซาก้า วิทยาเขต Suita ประเทศญี่ปุ่น

3. 3 *Escherichia coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBA 47 BI

3. 4 *Escherichia coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSO 2

3. 5 จุลินทรีย์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ในการทำให้เซลล์แตก

3. 5. 1 *Bacillus subtilis* 168 จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซาก้า วิทยาเขต Suita ประเทศญี่ปุ่น

3. 5. 2 *Micrococcus luteus* TISTR 745 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3. 5. 3 *Staphylococcus aureus* TISTR 118 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3. 5. 4 *Streptococcus faecium* IFO 3128 จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซาก้า วิทยาเขต Suita ประเทศญี่ปุ่น

3. 5. 5 *Escherichia coli* TISTR 780 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3. 5. 6 *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซาก้า วิทยาเขต Suita ประเทศญี่ปุ่น

4. การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

4. 1 การเลี้ยงบนอาหารแข็ง

ใช้อาหารแข็งสูตร LB (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยการขีดบนผิวหน้าอาหารให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ สำหรับแบคทีเรียที่มียีนต่อต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินอยู่บนพลาสมิด เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 9) บ่มเชื้อที่ 37 ° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.

4. 2 การเลี้ยงในอาหารเหลว

4. 2. 1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการเตรียมหัวเชื้อหรือเพื่อการสกัดพลาสมิด

ถ่ายโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 4. 1 ลงในอาหารเหลวสูตร LB ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 100 มล. สำหรับแบคทีเรียที่มียีนต่อต้านแอมพิซิลินอยู่บนพลาสมิด เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มล. บ่มเชื้อที่ 37 ° ซ. บนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอลซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ซ. ที่ความเร็ว 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 24 ชม.

4. 2. 2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อการเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบและเพื่อสกัดเอนไซม์

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4. 2. 1 มาปลูกถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร LB ในปริมาตร 1 %(ปริมาตร/ปริมาตร) สำหรับการเพาะเชื้อแบคทีเรียเพื่อการสกัดเอนไซม์จะใช้อาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม /มล. จะได้ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0. 05 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอลซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ซ. ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชม. หรือจนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรมีค่า เท่ากับ 0.25

5. การสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย

นำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 จำนวน 1.5 มล. มาใส่ใน หลอดไมโครฟิวจ์ขนาดความจุ 1.5 มล. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์แบคทีเรียกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่ 37° ซ. เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมอย่างเบาๆ โดยวิธีเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งบ่มที่ 0° ซ. เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมอย่างเบาๆ โดยวิธีเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็งบ่มที่ 0° ซ. เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนน้ำใสมากำจัดโปรตีนออกโดยนำมาผสมกับสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข ข้อ 4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยการเติมแอบโซลูทเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส ตั้งทิ้งไว้ที่ -20° ซ. เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 % (ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 1 มล. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนตะกอนไป ทำให้แห้งในเครื่องอบไล่ความชื้นที่ต่อเชื่อมกับเครื่องปั๊มสูญญากาศ จนกระทั่งตะกอนแห้งนำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 5) เก็บพลาสมิดที่ได้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20° ซ. การแยกอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอที่ต้องการทำได้โดยการย่อยสลายอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอเอส

6. การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์

นำดีเอ็นเอที่ต้องการตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ มาเติมลงในปฏิกริยาที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเรสตริกชั่นเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ที่มีความเข้มข้นตามที่บริษัทผู้ผลิตเรสตริกชั่นเอนไซม์เป็นผู้กำหนด เติมเรสตริกชั่นเอนไซม์ 3-5 หน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ตามที่กำหนดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิตามที่ผู้ผลิตเรสตริกชั่นเอนไซม์กำหนดเป็นเวลา 1-2 ชม.

กำจัดเรสตริกชั่นเอนไซม์ออก ด้วยการผสมกับสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของปฏิกริยา ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบ/ นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสชั้นบนมาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1. 5 มล.ใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการผสมกับแอบโซลูทเอทานอลจำนวน 2 เท่าโดยปริมาตรเมื่อเทียบกับปริมาตรของสารละลายส่วนใสที่ได้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 ° ซ. เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70%(ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 1 มล. นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8. 0 ทำให้ตะกอนที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยงแห้งในเครื่องอบไล่ความชื้นที่ต่อเชื่อมกับเครื่องปั๊มสูญญากาศ แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการใช้ชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอ Prep-A-Gene(Promega)

7. การหาขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

ต้มอะกาโรสเข้มข้น 1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8. 0 สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 ° ซ. ลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม(tracking dye) (ภาคผนวก ข ข้อ 12 ) ในอัตราส่วน 10 : 1 โดยปริมาตร หยดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการดึงหวีออกจากอะกาโรสที่แข็งตัวแล้ว หลุมละประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้แลมดาร์ดีเอ็นเอซึ่งย่อยด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ Hind III เป็นชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาด นำไปทำอิเลคโตรโพริซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ซึ่งบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ TAE พีเอช 8. 0 (ภาคผนวก ข ข้อ 6 ) โดยใช้ความต่างศักย์ 10 โวลต์/ซม. ของเจล จนกระทั่งสีน้ำเงิน ของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์โดยแช่แผ่นเจลอะกาโรสที่ได้ ในสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0. 5 ไมโครกรัม/มล. ของสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8. 0 เป็นเวลา 15-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร หาขนาดและความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของแถบที่ปรากฏกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มขาวดำความไวแสง 400 ผ่านแผ่นกรองแสงสีแดง (red filter).

8. การกำจัดหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 6 มากำจัดหมู่ฟอสเฟตโดยการเติม CIAP 0. 01 หน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณดีเอ็นเอ 1 พิโคโมล ในปฏิกริยาที่มีสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 30 นาที นำไปแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการตามวิธีในข้อ 7

9. วิธีการแยกดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยชุด Prep-A-Gene

นำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์มาแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างกันออกจากกันด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ด้วยระยะเวลาอันรวดเร็ว เพื่อป้องกันมิให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงจากผลของแสงอัลต้าไวโอเลต ตัดเอาแถบดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการตัดแผ่นเจลอะกาโรสบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาแล้ว ตัดชิ้นเจลอะกาโรสบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการให้เป็นชิ้นขนาดเล็กกว่า 1. 0 ลบ. มม. ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเพื่อหาปริมาตรเจลอะกาโรส เติมสารละลายบัฟเฟอร์บายดิง ( binding buffer) ในปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรเจล บ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37-55 ° ซ. เป็นเวลา 2-3 นาที จนกระทั่งเจลอะกาโรสหลอมอย่างสมบูรณ์เติม Prep-A-Gene Matrix ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที นำตะกอน Prep-A-Gene Matrix ที่มีดีเอ็นเอเกาะอยู่มาล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์วอลซ์ซิ่ง(washing buffer) ในปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจล ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์ออกจาก Prep-A-Gene Matrix โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์อีลูทชั่น (elution buffer) ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ Prep-A-Gene Matrix 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นแยกเอา Prep-A-Gene Matrix ออกที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดเอาส่วนน้ำใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอแขวนลอยอยู่โดยระวังให้ปราศจาก Prep-A-Gene Matrix โดยสมบูรณ์ ซึ่งอาจจะทำได้โดยนำส่วนน้ำใสนี้มาปั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อตกตะกอน Prep-A-Gene Matrix ที่อาจปนเปื้อนอยู่ออกใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ° ซ. เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

10. การเตรียมเซลล์คอมพลีเทนซ์ (Competent cell)

เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* JM109 บนอาหารแข็งสูตร LB ที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. ข้ามคืน เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ปริมาตร 20 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 100 มล. เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอล แบบควบคุมที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. ความเร็ว 200 รอบ/นาที ข้ามคืนเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร SOB ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. จำนวน 0.5 %(ปริมาตร/ปริมาตร) เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอลที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. ความเร็ว 200 รอบ/นาที จนกระทั่งค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรมีค่าอยู่ระหว่าง 0. 4-0. 6 จากนั้นแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 ° ซ. เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มากระจายในสารละลาย RF I (ภาคผนวก ข ข้อ 10) ปริมาตร 10 มล. อุณหภูมิ 4 ° ซ. แช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 ° ซ. เป็นเวลา 15 นาที กระจายเซลล์ที่ได้ในสารละลาย RF II (ภาคผนวก ข ข้อ 11) ปริมาตร 3 มล. ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ. แช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แบ่งสารแขวนลอยเซลล์คอมพลีเทนซ์ที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. หลอดละ 150 ไมโครลิตร เก็บเซลล์คอมพลีเทนซ์ที่ได้ที่อุณหภูมิ -70 ° ซ. ทันที

11. วิธีการทำทรานสฟอร์ม (Transformation)

เติมพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ จำนวน 100 นาโนกรัม ปริมาตรไม่เกิน 5 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยเซลล์คอมพลีแทนซ์จำนวน 150 ไมโครลิตรที่เตรียมได้จากข้อ 10 ผสมอย่างเบาๆ ให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 ° ซ. ทันที เป็นเวลา 90 วินาที นำกลับ มาแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ผสมอย่างเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 30 นาที เกลี่ยสารแขวนลอยเซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตรบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อขณะหลอมเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชม. คัดเลือกหาเซลล์ทรานฟอร์แมนท์

12. วิธีการผลิตเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่ถอดรหัสมาจากยีน *cwl* A ของ *Bacillus subtilis* 168 และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Pinpoint ™ Xa-1 protein purification system

12. 1 การสร้างพลาสมิด pSO2

จากรายงานของ Kuroda และ Sakiguchi (1990) ว่าพลาสมิดอนุพันธ์ของ pBA47 ที่มียีน *cwl* A ขนาดเล็กที่สุดที่สามารถถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ขนาด 29.9 กิโลดาลตัน ของ *Bacillus subtilis* 168 ได้คือพลาสมิด pBA 47 ESR ซึ่งมีขนาด 1. 35 กิโลเบสสอดแทรกอยู่ การศึกษานี้จึงนำพลาสมิด pBA 47 BI( ภาคผนวก ค ข้อ 1) ซึ่งเป็นพลาสมิดอนุพันธ์ของ pBA 47 ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เกิดจากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2. 0 กิโลเบสซึ่งมียีน *cwl* A ที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ขนาด 29.9 กิโลดาลตัน เข้ากับพลาสมิดพาหะ pUC 118( ภาคผนวก ค ข้อ 2 ) ที่ตำแหน่งเรสตริกชั่น *Eco*RI และ *Bal* 31 มาตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I ซึ่งตำแหน่งเรสตริกชั่น *Kpn* I นี้เป็นตำแหน่งเรสตริกชั่นเอนไซม์บนยีน *cwl* A และตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Bam* HI ซึ่งตำแหน่งเรสตริกชั่น *Bam* HI นี้เป็นตำแหน่งเรสตริกชั่นบนพลาสมิดพาหะ pUC118 เพื่อให้ได้สายนิวคลีโอไทด์ขนาด 1. 2 กิโลเบส ที่มีปลายเรสตริกชั่นชนิด *Kpn* I และ *Bam* HI ซึ่งเป็นบริเวณบนสายนิวคลีโอไทด์เดียวกันกับที่ Kuroda และ Sekiguchi (1990) ได้รายงานว่าสามารถถอดรหัสเป็นเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ข้างต้น แยกสายนิวคลีโอไทด์ขนาด 1. 2 กิโลเบสที่ต้องการนี้ออกจากสายนิวคลีโอไทด์อื่นตามวิธีในข้อ 7 แล้วทำให้สายนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวนี้บริสุทธิ์ด้วยชุด Prep-A-Gene ตามวิธีในข้อ 9 นำพลาสมิดพาหะ Pinpoint ™ Xa-1 ขนาด 3.3 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะ ที่มียีนที่เป็นรหัสของโปรตีนบริเวณที่เอนไซม์ไบโอตินไลเกสจดจำได้ เอนไซม์ไบโอตินไลเกสนี้ จะทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาการสร้างพันธะระหว่างไบโอตินกับโปรตีนนี้ และเพราะโปรตีนนี้เชื่อมต่ออยู่กับบริเวณตำแหน่งเรสตริกชั่นที่ยีนจากแหล่งอื่นจะสามารถสอดใส่เข้ามาได้ (multiple cloning site) ( ภาคผนวก ค ข้อ 3 ) ตัดยีนบริเวณดังกล่าวนี้ด้วยเอนไซม์เรสตริกชั่น *Kpn* I และ *Bgl* II กำจัดหมู่ฟอสเฟตจากปลายด้าน 5' ด้วยเอนไซม์ Calf intestine alkaline phosphatase ตามวิธีในข้อ 8 เชื่อมพลาสมิดที่เตรียมได้นี้เข้ากับสายนิวคลีโอไทด์ขนาด 1.2กิโลเบสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ข้างต้นด้วยเอนไซม์ทีโฟร์ไลเกส( T4 DNA Ligase) เรียกพลาสมิดที่ได้นี้ว่า pSO 2 พลาสมิด pSO 2 นี้เป็น

พลาสมิดขนาด 4. 5 กิโลเบส ที่มียีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ขนาด 29.9 กิโลดาลตันเชื่อมต่อกับยีนที่เป็นรหัสของโปรตีนบริเวณที่ไบโอตินจะมาเกาะ ผลการถอดและแปลรหัสของพลาสมิด pSO 2 จะได้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่มีไบโอตินเชื่อมติดอยู่ การแสดงออกของยีนทั้งสองนี้อยู่ภายใต้การควบคุมของยีนควบคุมชนิด *tac* (tac promoter)

12. 2 การสร้างทรานสฟอร์แมนซ์ที่ผลิตเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่มีไบโอตินเกาะ

นำพลาสมิด pSO 2 มาทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* JM109 ที่เป็นเซลล์คอมพลีเทนซ์ เนื่องด้วย *Escherichia coli* JM109 มียีนที่เป็นรหัสของโปรตีน Lac $I^q$ ซึ่งทำหน้าที่ระงับการแสดงออกของยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของยีนชนิด *tac* การสังเคราะห์เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ซึ่งสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ได้ในปริมาณที่มากเกินไปเป็นอันตรายต่อเซลล์จึงต้องควบคุมให้ยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase แสดงออกเฉพาะเวลาที่ต้องการโดยการเติมสารเหนี่ยวนำคือ IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside)ตรวจหาทรานฟอร์แมนท์ที่ต้องการโดยดูจากการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. และเติมผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ที่ต้มกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เพื่อทำลายโปรตีนชนิดต่างๆที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ จำนวน 0.5 กรัม/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 2 วันนำโคโลนีเดี่ยวของทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล.จำนวน 5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดขนาด 16 x 150 มม. บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชม. นำเซลล์ที่ได้มาสกัดเอาพลาสมิดตามวิธีในข้อ 5 แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Eco* RI เนื่องจากพลาสมิด pSO2 นี้มีตำแหน่งเรสตริกชั่น *Eco* RI เพียงตำแหน่งเดียว จึงทำให้พลาสมิด pSO 2 นี้มีลักษณะเป็นเส้นตรงขนาด 4.5 กิโลเบส เปรียบเทียบพลาสมิดรีคอมบิแนนท์หรือพลาสมิด pSO 2 กับพลาสมิด PinPoint™ Xa-1 พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ควรมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด Pinpoint ™ Xa-1 และเมื่อตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *Kpn* I และ *Sma* I แล้วควรจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่สกัดได้ขนาด 1.2 กิโลเบส ซึ่งเป็นยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase

12. 3 การเตรียมเอนไซม์ NA-L-alanine amidase จากทรานสฟอร์แมนท์ *Escherichia coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pSO 2

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของทรานสฟอร์แมนท์ *Escherichia coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pSO 2 ที่เตรียมได้จากข้อ 12. 2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ที่เติมแอมพิซิลินและไบโอตินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. และ 2 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ จำนวน 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. บนเครื่องเขย่าแบบรีซิโปรคอลความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชม. เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดิมจำนวน 1 ลิตร โดยใช้ 1 %(ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิและสภาวะเดิม ติดตามค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร จนกระทั่งมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0. 6 ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าช่วงปลาย (late log phase) เติม IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์บ่มที่อุณหภูมิและสภาวะเดิมต่ออีกเป็นเวลา 3 ชม. ปั่นแยกเอาเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 4 ° ซ. ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในสารละลาย บัฟเฟอร์ TK (ภาคผนวก ข ข้อ 7) ที่เติม PMSF (Phenylmethyl sulfonyl fluoride) ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0. 02 มิลลิโมลาร์ ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ที่อุณหภูมิ 0 ° ซ. โดยมีระยะเวลาในการให้คลื่นเสียง 5 วินาทีสลับกับการหยุด 1 วินาทีติดต่อกันเป็นเวลาทั้งหมด 8 นาที จำนวนเซลล์ที่แตกคิดเป็น 95 % ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด นำมาปั่นแยกเอากากเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 ° ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มากำจัดกรดนิวคลีอิกออกโดยการเติมสเตรปโตมัยซินซัลเฟตความเข้มข้นสุดท้าย 5 มก./มล. แช่ในน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนกรดนิวคลีอิกออกที่ความเร็ว 8,000 รอบ /นาที อุณหภูมิ 4 ° ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ. เพื่อนำไปใช้ต่อไป

12. 4 การทำให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่มีไบโอตินเกาะติดอยู่บริสุทธิ์ด้วยชุด Pinpoint ™ Xa protein purification system

12. 4. 1 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TDE (ภาคผนวก ข ข้อ 8) และสารละลาย ดี-ไบโอตินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตร Softlink™ soft release avidin resin ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาด 1x5 ซม. ที่

ปิดหรือหยุดการไหลของสารละลายได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ไบโอตินเกาะกับบริเวณเกาะที่ยังอาจเหลืออยู่ของอะวิดินเรซิน ชะด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 10 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 8 เท่าของปริมาตร อะวิดินเรซิน เพื่อชะเอาไบโอตินที่เกาะอยู่ที่บริเวณเกาะแรงดึงต่ำ (low biotin binding site) ออก จากนั้นชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7. 0 ติดตามวัดค่าพีเอชของสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ หยุดการชะเมื่อพีเอชของสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์มีค่าสูงกว่า 6. 8 โดยประมาณปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้โดยทั่วไปจะเป็น 8 เท่าของปริมาตรอะวิดินเรซิน ค่าความสามารถของ อะวิดินเรซิน ที่เตรียมได้นี้ในการเกาะกับไบโอติน (Capacity binding) เท่ากับ 34 นาโนโมลของไบโอติน/มิลลิกรัมของเรซิน

12. 4. 2 เติมเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่ได้จากข้อ 12. 3 จำนวน 0.5 มล. โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะ(Specific activity) ของเอนไซม์เท่ากับ 32 หน่อย./มล. ลงไปในคอลัมน์ที่มี อะวิดินเรซิน จำนวน 4 มล. ที่เตรียมได้จากข้อ 12. 4. 1 ด้วยอัตราเร็วของการไหล 1 มล./นาที ปิดคอลัมน์ไม่ให้มีสารละลายไหลออกเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ไบโอตินที่เกาะอยู่กับเอนไซม์ NA-L-alanine amidase เกาะกับ อะวิดินเรซิน ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TDE ซึ่งไม่มีไบโอตินเป็นองค์ประกอบ เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดละ 0.5 มล. ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของแต่ละหลอดจนกระทั่งค่าลดลงเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่าโปรตีนที่ไม่มีไบโอตินเกาะอยู่ถูกชะออกมาจนเกือบหมดแล้ว จากนั้นชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TDE ที่มีดี-ไบโอตินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์และติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของแต่ละหลอดเช่นเดียวกันกับข้างต้น หยุดชะเมื่อค่าการดูดกลืนแสงลดลงจนมีค่าเข้าใกล้ศูนย์

12. 5 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่เตรียมได้

12. 5. 1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

12. 5. 1. 1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และ 260 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณตามสูตร

ความเข้มข้นของโปรตีน(มก./มล.) = 1.55 $A_{280}$ - 0. 76 $A_{260}$

เมื่อ $A_{280}$ และ $A_{260}$ คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตรตามลำดับ

12. 5. 1. 2 วิธีการของลาว์รี่ (Lowry method) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนจำนวน 1. 0 มล. ผสมกับลาว์รี่ซี (ภาคผนวก ข ข้อ 13.3) จำนวน 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 13.4) จำนวน 0. 5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาปริมาณโปรตีน โดยการเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาจากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปฏิกริยาที่มีสารละลายโปรตีนโบไวซีรัมอัลบูมิน (bovin serum albumin) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาคผนวก ข ข้อ 13)

12. 5. 2 การตรวจพิสูจน์เอนไซม์ที่เตรียมได้ว่าเป็นเอนไซม์ NA-L-alanine amidase

12. 5. 2. 1 การตรวจหากรดอะมิโนอิสระในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์ โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้

เติมสารละลายฟลูออโรไดไนโตรเบนซีน จำนวน 60 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 14.1) ลงในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้ ในสภาวะที่เติม PMSF ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02 มิลลิโมลาร์ เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส จำนวน 0.6 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 60 ° ซ. เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.4 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร คำนวนหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นพี แอล-อะลานิน ที่เกิดขึ้นจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร และค่าความเข้มข้นของกรดอะมิโน แอล-อะลานิน (DNP-L-alanine )ในปฏิกริยา (ภาคผนวก ข ข้อ 14)

12. 5. 2. 2 การตรวจหาน้ำตาลรีดิวซ์อิสระในผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้

ผสมสารละลายโปแตสเซียมเฟอริไซยาไนด์เข้มข้น 0.05 % และสารละลายคาร์บอนเนต-ไซยาไนด์ (ภาคผนวก ข ข้อ 14.2 ) อย่างละ 1 มล. ลงใน 1 มล. ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ที่เตรียมได้ ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงทันทีในอ่างน้ำไหลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 2.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 20 ° ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวนหาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์อิสระที่เกิดขึ้นจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในปฏิกริยา ( ภาคผนวก ข ข้อ 14 )

12. 5. 3 การหากิจกรรมของเอนไซม์

12. 5 .3. 1 การเตรียมผนังเซลล์เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น ( substrate )

นำเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร LB ปริมาตร 10 ลิตร มาแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสคลอไรด์ พีเอช 8. 0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่เติม PMSF ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0. 02 มิลลิโมลาร์ เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ทำให้เซลล์แตกโดยเครื่องอัดความดันสูง (French pressure) ที่ความดัน 1600 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 4 ° ซ. ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนใสหลังการปั่นเหวี่ยงแยกเอากากเซลล์(cell debris)ออก ที่ความเร็ว 8,000 รอบ /นาที อุณหภูมิ 4 ° ซ. เป็นเวลา 15 นาที มาปั่นแยกเอาผนังเซลล์ที่ความเร็ว 16,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 ° ซ. เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนผนังเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริสคลอไรด์ พีเอช 8. 0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วแขวนลอยตะกอนผนังเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งวัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ความเข้มข้นสุดท้าย 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อทำลายโปรตีนทุกชนิดที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์ ล้างผนังเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้งแล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องไลโอฟิไลเซชั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ° ซ. เพื่อนำไปใช้ต่อไป

12. 5. 3. 2 การหากิจกรรมของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase ผสมผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 ที่ต้มกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ที่เตรียมได้จากข้อ 12. 5. 3 .1 จำนวน 0.0025 มก. ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ TK เติมเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 12. 3 จำนวน 0. 5 มล. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 5 มล. ด้วยน้ำกลั่น จะได้ค่าการดูดแสงเริ่มต้นของสารละลายผสมข้างต้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรประมาณ 0. 3 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 ° ซ. ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารละลายผสมทุกๆ 5 นาที โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาการย่อยสลายผนังเซลล์ข้างต้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรลดลง 0. 001 ภายในเวลา 1 นาทีที่สภาวะทดสอบ( Roger et al., 1984)

12. 5. 3. 3 การวิเคราะห์ลักษณะและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบแผ่น (SDS-PAGE)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 8x10 ซม. 2 แผ่นเข้าด้วยกันสอดแผ่นพลาสติก(spacer) ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง แล้วเทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ที่มีความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์เจลเท่ากับ 20 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ( ภาคผนวก ข ข้อ 15.9 ) ลงไปในแผ่นแก้วให้มีความสูง 4. 5 ซม. หยดน้ำลงบนผิวหน้า เจลเล็กน้อยเพื่อเป็นการปรับระดับเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาทีจนกระทั่งเจลแข็งตัวดีเทน้ำออก ซับขอบบนของเจลให้แห้งด้วยกระดาษกรอง whatman แล้ววางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียม ช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (ภาคผนวก ข ข้อ 15.10 ) ลงไป เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วค่อยๆดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยสารละลายอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 15.1 ) แล้วเติมสารละลายอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ลงในช่องสำหรับใส่บัฟเฟอร์และช่องสำหรับใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานละลายในสารละลายแซมเปิลบัฟเฟอร์( ภาคผนวก ข ข้อ 15.6) ต้มที่อุณหภูมิ 95 ° ซ. เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นหยอดตัวอย่างลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเลคโตรโฟริซิสที่ความเข้มของกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาถึงเซพาเรติงเจลแล้วให้ลดความเข้มกระแสลงเหลือ 75 มิลลิแอมแปร์ รอจนกระทั่งสีของบรอม

ฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาจนเกือบปลายสุดแผ่นเจล จากนั้นแกะแผ่นเจลมาแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวก ข ข้อ 15.11) เป็นเวลา 30 นาที ชะล้างสีย้อมโปรตีนส่วนเกินออกด้วยสารละลายชะล้างสี (ภาคผนวก ข ข้อ 15.12) จนเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจน

12. 6 วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA-L- alanine - amidase ที่เตรียมได้ในการทำให้แบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบ ซึ่งมีโครงสร้างผนังเซลล์ต่างกันแตก

ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่จะทดสอบ ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวสูตร LB ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. บนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 16 ชม. เป็นหัวเชื้อเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมโดยใช้ปริมาตร 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิและสภาวะเดิม ติดตามการเจริญโดยวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เมื่อค่าความขุ่นของเซลล์มีค่าเท่ากับ 0. 25 จะได้เซลล์ที่ระยะการเจริญแบบอัตรก้าวหน้าช่วงกลาง ( mid log phase ) นำเซลล์จำนวน 10 มล. มากรองด้วยแผ่นกรอง Millipore membrane ขนาดรูพรุน 0. 45 ไมครอน ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิ 37 ° ซ. จำนวน 10 มล. 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์สูตร TK (ภาคผนวก ข ข้อ 7) จำนวน 5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 50 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 ° ซ. ติดตามวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณอัตราเร็วของเอนไซม์ในการทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกจากสมการ

อัตราเร็วของการแตกของเซลล์แบคทีเรีย (k) =

$$\frac{\ln (\text{ค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ 650 นาโนเมตร} / \text{ค่าความขุ่นสุดท้ายที่ 650 นาโนเมตร})}{\text{เวลา (นาที)}}$$