รายการอ้างอิง

Akrigg , A., and Ayad , S.R ., 1970. Studies on the competence-inducing factor of *Bacillus subtilis* . Biochem. J. 117 : 397-403.

Brown , W. C. , Fracer , D. K. and Young , F. 1969. Problem in purification of a *Bacillus subtilis* autolytic enzyme caused by associated with teichoic acid . Biochem. Biophy. ACTA. 198 : 308-315.

_____. 1973 . Rapid method for extracting autolysin from *Bacillus subtilis.* App. Microbiol. 25 : 295-300.

Chatterjee , A.N. , Wong , W. , Young , F.E . ,and Gilpin , R.W. 1976. J.Bact 125: 961-967.

Fan , D . P. 1970. Cell wall binding properties of the *Bacillus subtilis* autolysin(s). J. Bact. 103 : 488-493.

Fein , J.E ., 1979. Possible involvement of bacterial autolytic enzyme in flagellar morphogenesis. J.Bact : 137 : 933-946.

_____., and Rogers , H. J. 1976 . Autolytic enzyme deficient matants of *Bacillus subtilis* 168 . J. Bact 127 : 1427-1442.

Forsberg , C.W., Wyrick , P.D. ., Ward , J.B. ., and Rogers , H.J. 1973. Effect of phosphate limitation on the morphology and cell wall composition of *Bacillus licheniformis* and its phosphoglucomutese-deficient mutants. J.Bact. 113 : 963-984.

Foster , J. 1991. Cloning, expression, sequencing analysis and biochemical characterization of an autolytic amidase of *Bacillus subtilis* 168 *trpC2* . J. Gen. Micro.137 : 1987-1998.

Harbold , D. K. , and Glaser , L . 1975 . *Bacillus subtilis* N-acetylmuramic acid L- alanine amidase . J. Bact 111 : 272-283.

Jolles , P ., and Jolles ,. J. 1984. What's new in lysozyme research ? Alway a model system today as yesterday . Molecul cell 63 : 165-189.

Knox , K.W ., and A..J Wicken. 1973. Immumological properties of teichoic acid. Bacteriol. Rev. 37 : 215-257.

Kuroda , A . , and Sekiguchi , J. 1990 . Cloning , Sequencing and Genetic mapping of *Bacillus subtilis* cell wall hydrolase gene . J. Gen. Micro. 136 : 2209-2216 .

_____ . , Imazeki , M. , and Sekiguchi , J . 1991. Purification and characterization of cell wall hydrolase encoded by *cwl* A gene of *Bacillus subtilis* . FEM. Micro. lett. 81 : 9-14 .

Roger , H. J. , Perkin , H. R. , and Ward , J. B. 1980 . Microbial cell wall and membrane London New York Chapman and Hall.

Miyao , M ., Ozaki , H . 1970. Clinical results of artificial infant feeding with lysozyme. Final report Department of pediatrics , Tokoshima university school of medicine.

Morsky ,P. , 1982. Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: Reexamination of reaction condition. Anal. Bio chem. 128: 77-85.

Muraki , M. , Jikami , Y., Tanaka , H. , Kishimoto , F. , Agni , H., Ogino , S., and Nakasato , S., 1985. Expression of synthetic human lysozyme gene in *Escherichia coli.* Agric. Biochem. 49 : 2829-2831.

Nakasawa , S. , Itagaki ., M . 1965 . Fundamental studies on the antibiotics properties of a bacteriolytic enzyme lysozyme . Final report Reseach institute of communicative disease , Tokyo university . Tokyo , Japan.

Pooley , H.M . , 1976 . Turnover and spreading of old wall during surface growth of *Bacillus subtilis.* J.Bact 125: 1139-1147.

_____ . 1976. Layered distribution , according to age , within the cell wall of *Bacillus subtilis* . J. Bact 125:1139-1147.

Promega , Technical manual TM 028. 1994. Medison , USA.

Schleifer , K. H. and Kandler , O. 1972. Bact. Rev. 36 : 407-477.

Tilby , M.J. 1978. J. Bact 136:10-18.

Wagabayashi , O ., Ebihara , M ., Azuma , E., 1970 . Clinical use of lysozyme in the field of

surgery. Medical report Department of first surgery , Itabashi hospital of Nihon university.

Warth , A.D. , Inspore V.eds. , Halrenson ,H.O. , Hanson , R. and Campbell .L.L . ,1972. pp. 28-34.Washington D.C. Am.Soc.Microbiol.

Young , F. E . , 1966. Autolytic enzyme associated with cell walls of *Bacillus subtilis*. J. Biol. chem. 241 : 3462-3467.

Young , F. E. , and Spizizen , J. 1963. Biochemical aspects of competence in *Bacillus subtilis* transformation system II autolysin enzyme binding cell walls. J.Biol. chem. 238 : 3136-3130.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

แบคโต-ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
วุ้นผง(สำหรับอาหารแข็ง)	20	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ° ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร SOB

แบคโต-ทริปโตน	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
โปแตสเซียมคลอไรด์	2.5	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟต	10	มิลลิโมลาร์

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ° ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย I

กลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ พีเอช 8.0	25	มิลลิโมลาร์
อีดีทีเอ พีเอช 8.0	10	มิลลิโมลาร์

2. สารละลาย II

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล	0.2	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 %	1.0	มล.
น้ำกลั่น	8.8	มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน

3. สารละลาย III

โปแตสเซียมอะซิเตดความเข้มข้น 5 โมลาร์	60	มล.
กรดอะซิติก	11.5	มล.
น้ำกลั่น	28.5	มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน

4. สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม

นำฟีนอลที่ผ่านการทำให้สมดุล (equilibrate) ด้วย Trisma-Base พีเอช 8.0 และเติม 8-Hydroxyquinaline 0.1 % ผสมกับ chloroform-isoamyl-alcohol ในอัตราส่วน 25 : 4 : 1

5. สารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0

ทริส-เบสความเข้มข้นสุดท้าย	10	มิลลิโมลาร์
อีดีทีเอความเข้มข้นสุดท้าย	1	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งสองแล้วปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ค่าพีเอชสุดท้ายเป็น 8.0

6. สารละลายบัฟเฟอร์ TAE พีเอช 8.0 (50x)

ทริส-เบส	242	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มล.

อีดีทีเอความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 100 มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1 ลิตร.

7. สารละลายบัฟเฟอร์ TK

ทริส-เบสความเข้มข้นสุดท้าย	100 มิลลิโมลาร์
โปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย	100 มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งสองแล้วปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ค่าพีเอชสุดท้ายเป็น 8.0

8. สารละลายบัฟเฟอร์ TDE

ทริส-เบสความเข้มข้นสุดท้าย	50 มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย	100 มิลลิโมลาร์
ดีดีทีความเข้มข้นสุดท้าย	4 มิลลิโมลาร์
อีดีทีเอความเข้มข้นสุดท้าย	2 มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ค่าพีเอชสุดท้ายเป็น 8.0

9. แอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล.

แอมพิซิลิน (ในรูปเกลือโซเดียม) 250 ไมโครกรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. แล้วนำมากรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 ° ซ.

10. สารละลาย RF I

โปแตสเซียมอะซิเตด	0.294 กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	1.120 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.148 กรัม
แมงกานีสคลอไรด์	0. 990 กรัม
กลีเซอรอล 15 % (ปริมาตร/ปริมาตร)	12.190 มล.

เติมน้ำจนปริมาตรครบ 20 มล.

11. สารละลาย RF II

MOPS	0.21 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.10 กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	0.12 กรัม

กลีเซอรอล 15 % (ปริมาจร/ปริมาตร) 12.190 มล.

เติมน้ำจนปริมาตรครบ 20 มล.

12. สีติดตาม (tracking dye)

กลีเซอรอล	10 มล.
2-เมอเคปโตเอทานอล	5 มล.
20% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10 มล.
0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 6. 8	12. 5 มล.
สารละลาย 1%(น้ำหนัก/ปริมาตร) บรอมฟีนอลบลู	0.1 มล
น้ำกลั่น	12.5 มล.

13 . สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีลาวรี่ (Lowry Method)

13. 1 ลาวรี่ เอ (Lowry A)

โซเดียมคาร์บอเนต	60 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	12 กรัม
โซเดียมโปแทสเซียมทาร์เทต	0. 6 กรัม
น้ำกลั่น	3000 มล.

13. 2 ลาวรี่ บี (Lowry B)

คอปเปอร์ซัลเฟต	50 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

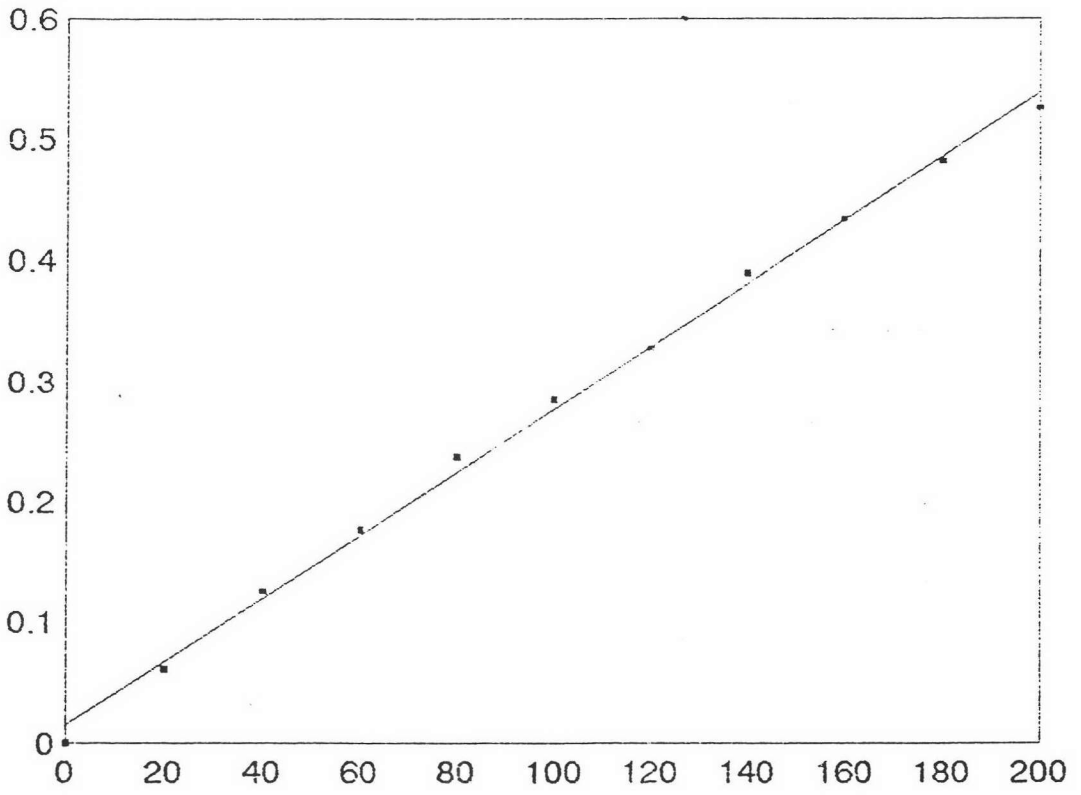
13. 3 ลาวรี่ ซี (Lowry C)

ผสม ลาวรี่เอ และลาวรี่บี (50: 1)

13. 4 สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin Phenol Reagent)

ผสมสารละลายโฟลินฟีนอล และน้ำ (1:1)

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร



รูปที่ 33 กราฟมาตรฐานของโปรตีนบีเอสเอเพื่อใช้หาความเข้มข้นของโปรตีนทดสอบ

14. สารละลายสำหรับตรวจพิสูจน์ชนิดของเอนไซม์ที่เตรียมได้

14. 1 สารละลายฟลูออโรไดไนโตรเบนซีน

ผสมฟลูออโรไดไนโตรเบนซีน 130 ไมโครลิตร ลงไปในเอธานอลเข้มข้น 100 % (ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 10 มิลลิลิตร

14. 2 สารละลายคาร์บอเนต-ไซยาไนด์

ผสมโซเดียมคาร์บอเนต 26.5 กรัม และโปแตสเซียมไซยาไนด์ 3.25 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

14. 3 สารละลายสี (color reagent) เพื่อการตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ประกอบด้วย

สารละลายที่ 1. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ของกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

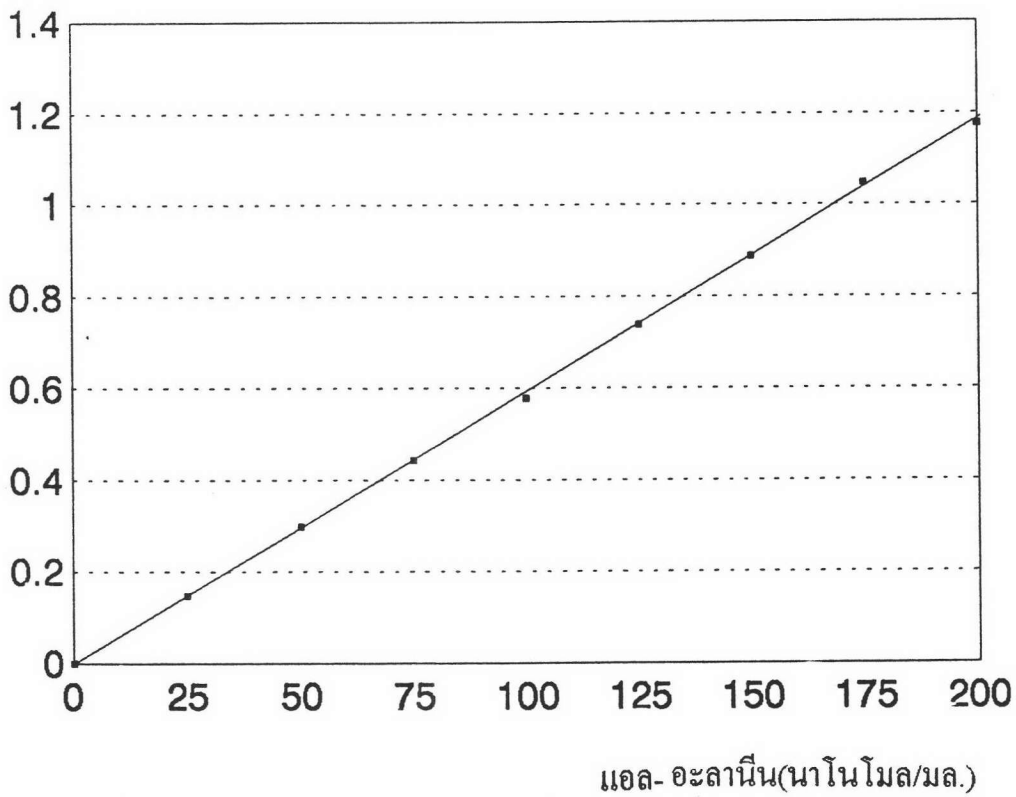
สารละลายที่ 2. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ของกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

สารละลายที่ 3. สารละลายโพลีเอธิลีนไกลคอลเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ของกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

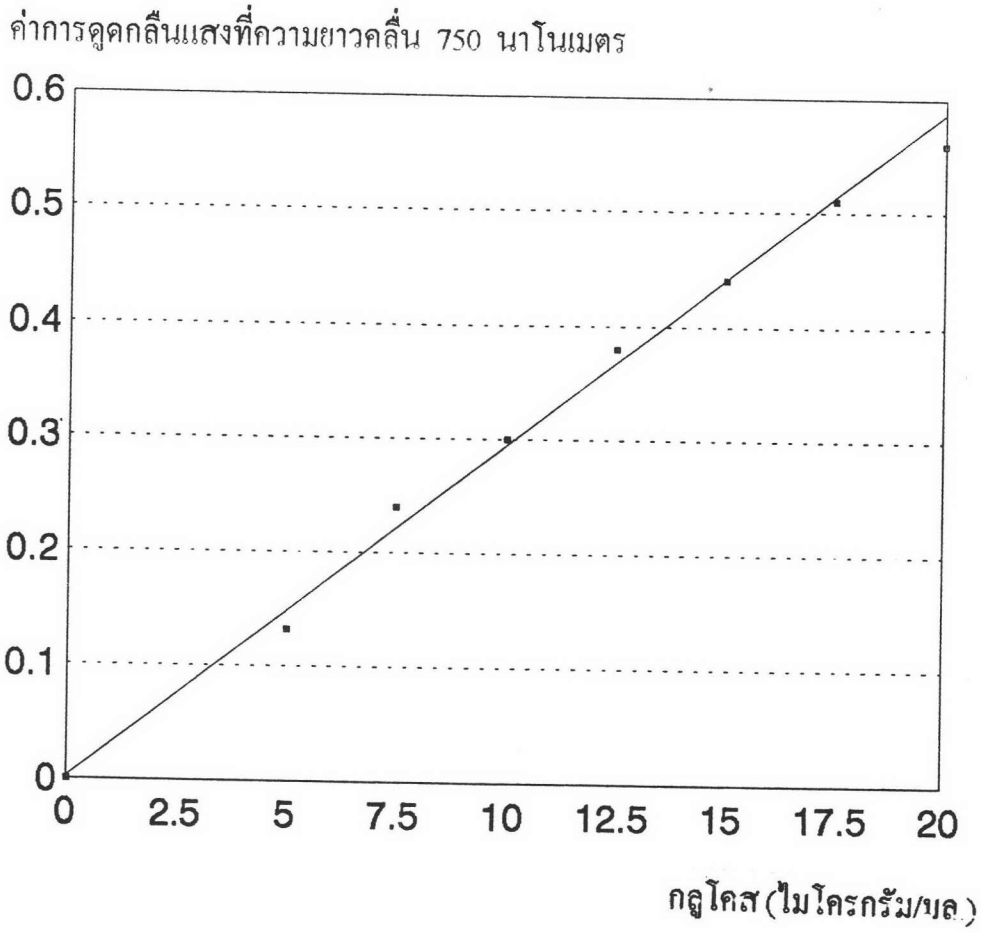
สารละลายที่ 4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

ผสมสารละลายที่ 1: สารละลายที่ 2: สารละลายที่ 3: สารละลายที่ 4 ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของสารละลายผสมนี้ต้องไม่สูงเกินกว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมระหว่างสารละลายที่ 1: สารละลายที่ 2: สารละลายที่ 4 ในอัตราส่วน 1: 1 : 2

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร



รูปที่ 34 กราฟมาตรฐานกรดอะมิโนอิสระเพื่อใช้หาความเข้มข้นของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกริยา



รูปที่ 35 กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้หาความเข้มข้นของน้ำตาล
รีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเพื่อในปฏิกริย-

15. สารละลายที่ใช้ในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Slab Gel Electrophoresis)

15. 1 10 x สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์

(0. 25 โมลาร์ ทริส 1. 92 โมลาร์ไกลซีน)

ทริส	30 กรัม
ไกลซีน	144 กรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

15. 2 1x สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์

(0. 025 โมลาร์ทริส 0. 192 โมลาร์ไกลซีน)

10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์	100 มล.
20% (น้ำหนัก/ปริมาตร)โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	5 มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

15. 3 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร)โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต(SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	100 มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	500 มล.

15. 4 4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 6.8 (0.5 โมลาร์ทริส)

ทริส	30. 275 กรัม
20%(น้ำหนัก/ปริมาตร)โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10 มล.
TEMED	1 มล.

ปรับค่าพีเอชให้เป็น 6. 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

15. 5 4 x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 8 .8 (0.5 โมลาร์ทริส)

ทริส	30.275 กรัม
20%(น้ำหนัก/ปริมาตร)โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10 มล.
TEMED	1 มล.

ปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

15. 6 2 x บัฟเฟอร์ที่จะใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample Buffer)

กลีเซอรอล	10 มล.

2-เมอเคปโตเอทานอล	5 มล.
20% (น้ำหนัก/ปริมาตร)โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10 มล.
0.5 โมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 6. 8	12. 5 มล.
สารละลาย 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)บรอมฟีนอลบลู	0.1 มล
น้ำกลั่น	12.5 มล.

15. 7 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide stock)

อะคริลาไมด์	30 กรัม
BIS	0.8 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล.

15. 8 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (เตรียมก่อนใช้)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0. 1 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มล.

15. 9 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (Separating Gel Solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	1 กรัม
4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 8.8	5 มล.
1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0. 25 มล.
น้ำกลั่น	0. 50 มล.

15. 10 สารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking Gel Solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	1 กรัม
4x สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พีเอช 6 . 8	2. 5 มล.
1%(น้ำหนัก/ปริมาตร) สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0. 25 มล.
น้ำกลั่น	6. 25 มล.

15. 11 สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining Solution)

โคแมสซีบริลเลียนบลู จี-250	2 กรัม
เมทานอล	500 มล.
กรดอะซิติก	100 มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

15. 12 สารละลายสำหรับล้างสี(Destaining Solution)

เมทานอล	50 มล.
กรดอะซิติกเข้มข้น	70 มล.

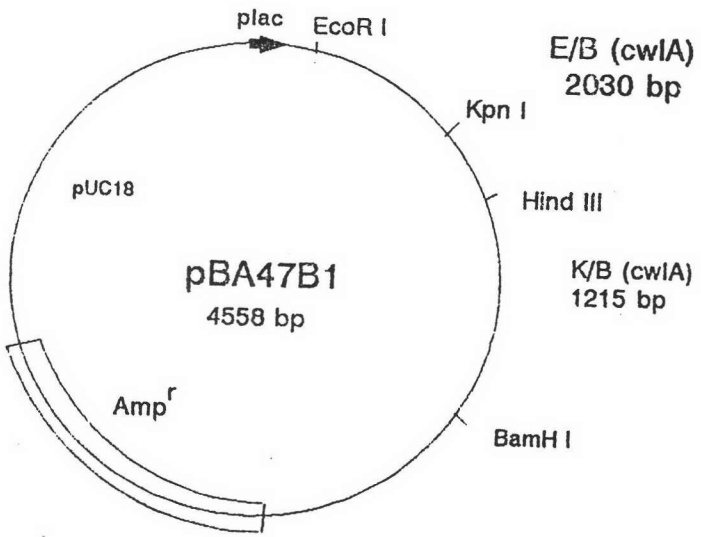
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

15.13 ขนาดน้ำหนักของสารละลายผสมของโปรตีนมาตราฐาน

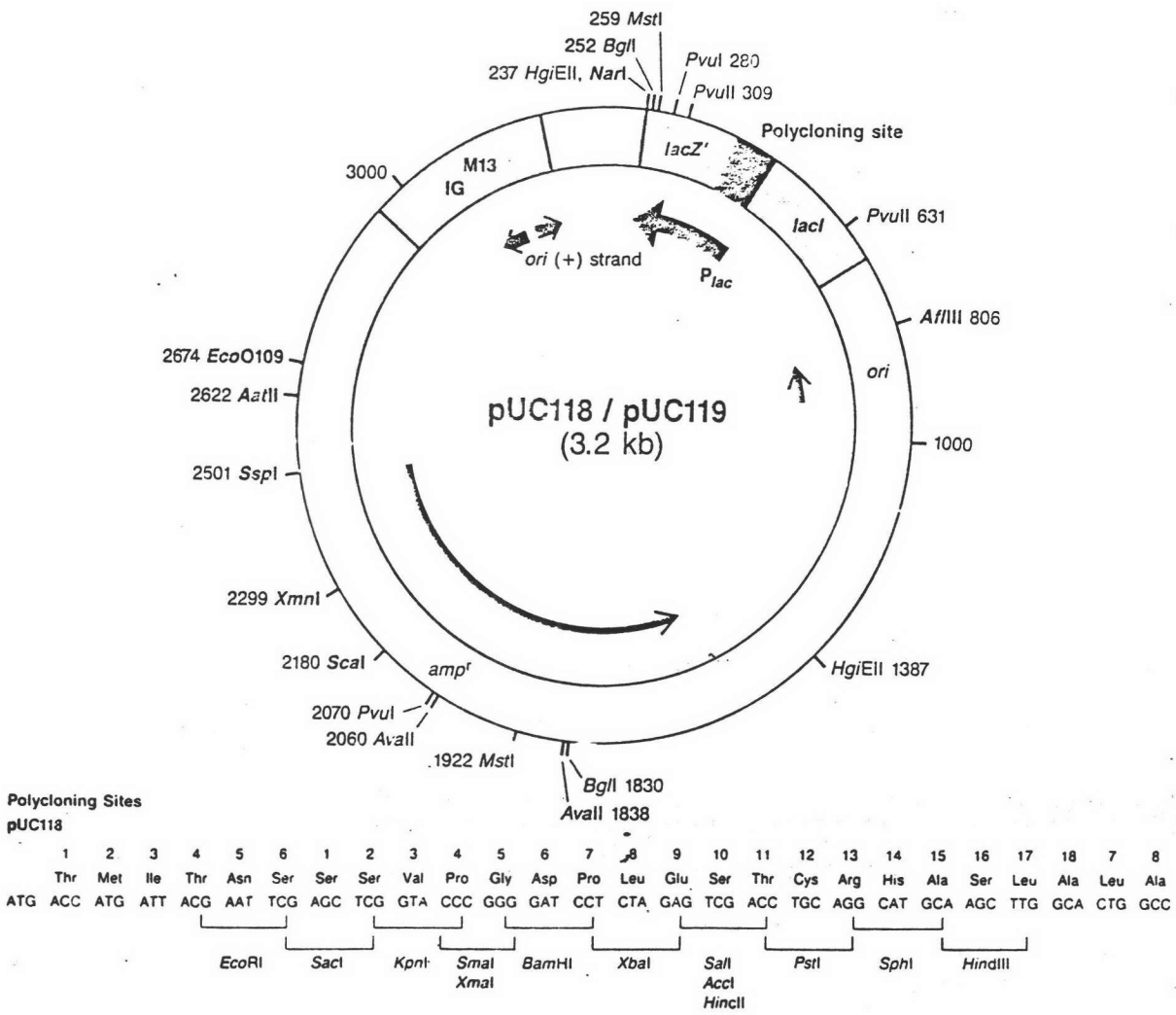
ดาลตัน	ชนิดของโปรตีน
66,000	Bovine serum albumin
45,000	Chicken egg ovalbumin
36,000	Rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
29,000	Bovine erythrocytes carbonic anhydrase
24,000	Bovine pancreas trypsinogen
20,000	Soybean trpysin inhibitor
14,200	Bovine milk α-lactalbumin
6,500	Bovine lung agrotinin

ภาคผนวก ค

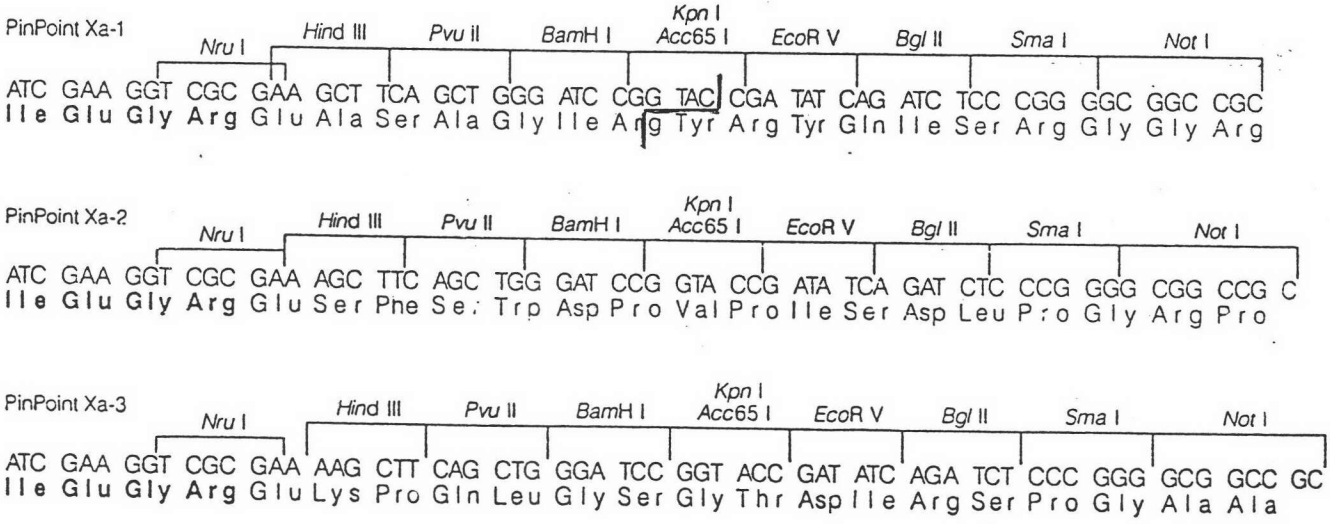
1. pBA 47 BI



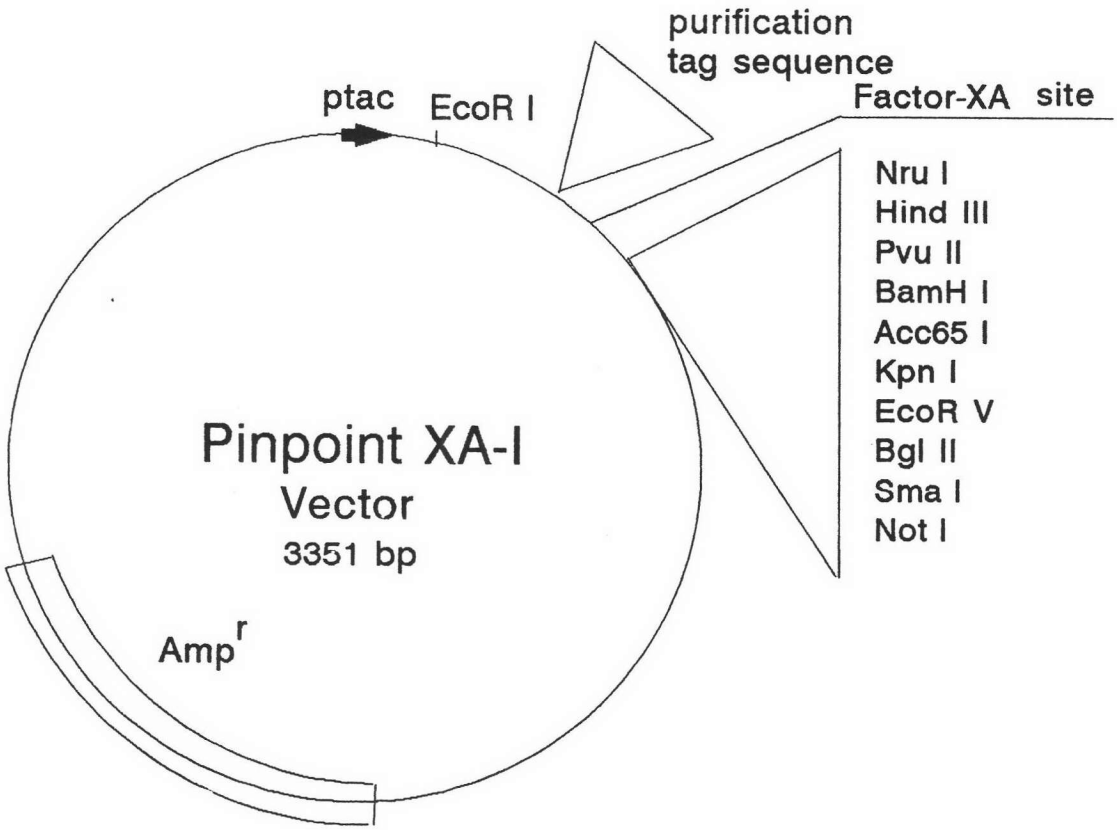
2. pUC 118


259 MstI
252 BglI
237 HgiEII, NarI
PvuI 280
PvuII 309
Polycloning site
lacZ'
lacI
PvuII 631
AflIII 806
ori
1000
HgiEII 1387
BglI 1830
AvaII 1838
1922 MstI
2060 AvaII
2070 PvuI
2180 ScaI
2299 XmnI
2501 SspI
2622 AatII
2674 EcoO109
3000
M13
IG
ori (+) strand
Plac
ampr
pUC118 / pUC119
(3.2 kb)
Polycloning Sites
pUC118
1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 7 8
Thr Met Ile Thr Asn Ser Ser Ser Val Pro Gly Asp Pro Leu Glu Ser Thr Cys Arg His Ala Ser Leu Ala Leu Ala
ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG GCC
EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
XmaI
BamHI
XbaI
SalI
AccI
HincII
PstI
SphI
HindIII

3. Multiple cloning site



4. ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แฟกเตอร์เอกซ์เอโปรติเอส



Factor-Xa protease:Ile-Glu-Gly-Arg

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร(มล.)	โปรตีน		กิจกรรม (Activity)	แอกติวิตี้จำเพาะ (Specific activity)	ความบริสุทธิ์(เท่า) (Purification fold)
		(มก./มล.)	(มก.)	หน่วยทั้งหมด (Total activity)		
1. เอนไซม์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์	0.5	35.0	17.5	572.5	32.7	1
2. เอนไซม์หลังจากผ่านอะวิดินคอลัมน์	3.0	0.622	1.865	280.5	150.4	4.59

ตารางที่ 10 ตารางแสดงความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ NA- L-alanine amidase หลังจากผ่านอะวิดินคอลัมน์.

ประวัติผู้เขียน

นายโสภณ สิริศรัทธา เกิดเมื่อวันที่ 1 ตุลาคม พศ. 2512 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2535 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทในหลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรมในปีการศึกษา 2535