บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องสเปคโตรโฟโต-มิเตอร์	1. Shimadzu UV-visible UV-240	Shimadzu, Japan
	2. Spectronic 20D	Milton Roy Company, U.S.A.
เครื่องเซนตริฟิวจ์	1. Beckman centrifuge J-21 C	Beckman Instrument Inc., U.S.A.
	2. Top bench centrifuge Minor 35	MSE Ltd. England
อ่างควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า	Reciprocal water bath shaker model 01-PF-623	Heto, Denmark
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ	1. G.E. Incubator No. 0607040	Grundy Equipment, Germany
	2. Heraeus Type B 5050 E	Heraeus, Germany
เครื่องวัดพีเอช	Zeromatic IV pH meter Radiometer	Beckman, U.S.A.
เครื่องทำลายเซล	Sonicator model W 375	Heat Systems Ultrasonics, Inc., U.S.A.
เครื่องเขย่า	Vortex-Genie No. 16824	Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y. 11716, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่อง peristaltic pump	Type SJ-1211 H	Chromatograph Alto corporation, Japan
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก	Nuova 7 stir-plate	Sybron/Thermo-lyne, U.S.A.
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	Autoclave model HA-3D	Hirayama Manufacturing Corperation. Japan
High Performance Liquid Chromato-graphy	1. Pye Unicam PU-4895 LC Interface	Phillip, Germany
	2. Liquid Chromatograph LC-3A	Shidmadzu, Japan
เครื่องนับโคโลนี	Colony counter	Dark field, Quebec American Optical, U.S.A.

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Escherichia coli HD-1 เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

Pseudomonas testosteroni ATCC 11996 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส สั่งซื้อจาก American type culture collection ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. นิโคตินาไมด์ อะดีโนซีน ไดนิวคลีโอไทด์ (ออกซิไดส์ฟอร์ม) (Nicotinamide Adenosine Dinucleotide, NAD; oxidized form)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
2. นิโคตินาไมด์ อะดีโนซีน ไดนิวคลีโอไทด์ (รีดิวส์ฟอร์ม) (Nicotinamide Adenosine Dinucleotide, NADH; reduced form)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
3. ฟีนาซีน เมทโธซัลเฟต (Phenazine Methosulfate)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
4. ไนโตรบลู เตตราโซเลียม (Nitroblue Tetrazolium)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
5. เทสโทสเทอโรน (Testosterone)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
6. อันโดรสเทอโรน (Androsterone)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
7. กรดดีไฮโดรโคลิก (Dehydrocholic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
8. กรดคีโนดีออกซีโคลิก (Chenodeoxycholic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
9. กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก (12-ketochenodeoxycholic acid)	Rokko, Issraels

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
10. กรดลิโทโคลิก (Lithocholic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
11. กรดโคลิก (Cholic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
12. โซเดียมโคเลท (Sodium Cholate)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.
13. กรดแอลจินิก (Algenic acid)	Sigma Chemicals Co., U.S.A.

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา, บริษัท BDH Chemical Ltd., ประเทศอังกฤษ, บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ เป็นต้น

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ E. coli HD-1

ใช้สูตรอาหารของ Luria-Bertani (Luria, Adams, Teng., 1960) ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ถ้าเป็นอาหารชนิดแข็ง เติม Bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

012587

2.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ P. testosteroni (ATCC 11996)

2.3.2.1 อาหารสูตร Nutrient broth ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซนต์ (NB + 2% สารสกัดจากยีสต์) (ATCC, 15th edition, 1982) ประกอบด้วย Nutrient broth 0.8 เปอร์เซนต์ และสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซนต์ ถ้าเป็นอาหารชนิดแข็ง เติม Bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3.2.2 อาหารสูตร Marcus และ Talalay (Marcus, P.I. and Talalay, P., 1956) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2	กรัม
Trace element	10	มิลลิลิตร
(สารละลาย Trace element 1 ลิตร ประกอบด้วย		
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.3H_2O$)	0.5	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.05	กรัม
สารละลายกรดซัลฟุริค 0.1 โมลาร์	10	มิลลิลิตร)

2.4 การเตรียมสารละลาย

2.4.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์สำหรับหาปริมาณโปรตีน (alkali copper)

ก. สารละลาย ก. ละลายโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทต 3.3 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลาย ข. ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1.25 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ค. สารละลาย ค. ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 25 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก. 1 มิลลิลิตร สารละลาย ข. 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ค. 100 มิลลิลิตร ก่อนใช้

2.4.2 สารละลายฟีนอล (phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร 85 เปอร์เซนต์กรดฟอสฟอริค 25 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ (reflux) ด้วยความร้อนต่ำ ๆ นาน 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเก็บในขวดสีชา สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน 3-6 เดือน เวลาใช้ทำให้เจือจาง 1 เท่า ด้วยน้ำกลั่น

2.4.3 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0

ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 9.56 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต 5.49 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.4.4 สารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.250 โมลาร์

พีเอช	โซเดียมอะซีเตท (กรัม)	กรดอะซีติก (มิลลิลิตร)
3.0	0.3610	14.33
4.0	3.1011	12.42
5.0	13.2823	5.32
6.0	19.7798	0.79

ละลายโซเดียมอะซีเตทและกรดอะซีติก ตามตารางข้างบน ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ตามต้องการ แล้วเติมน้ำจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

2.4.5 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.25 โมลาร์

พีเอช	โซเดียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟต (กรัม)	ไดโซเดียมไฮโดรเจน-ฟอสเฟต (กรัม)
6.0	37.4112	2.1578
7.0	24.3844	14.0114
7.5	13.2764	24.1190
8.0	5.447	31.2457

ละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ตามต้องการ แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

2.4.6 สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ 0.25 โมลาร์ พีเอช 9.5

ละลายไกลซีน 19.1505 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 9.5 ด้วย 1 โมลาร์ ไซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2.4.7 สารละลายปฏิกิริยาสำหรับเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก (Bioconversion)

ใส่กรดดีไฮโดรโคลิก (DHCA) 1 กรัม ลงในสารละลาย 0.25 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6 ปริมาตร 1 ลิตร เติมทวีน-80 (Tween-80) 1 มล.autoclave เพื่อให้สับสเตรทละลายหมด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.5 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

แบ่งเป็น 2 แบบคือ

2.5.1 การเก็บระยะสั้น

เก็บบนจานเพาะเลี้ยงอาหารสูตรอุดมที่ 4 องศาเซลเซียส วิธีนี้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 เดือน

2.5.2 การเก็บระยะยาว

ผสมเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวกับกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล ในขวดจุกเกลียว เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส วิธีนี้สามารถเก็บเชื้อ

จุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 ปี

2.6 วิธีการเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของเชื้อ

2.6.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง เขี่ยเชื้อจากเชื้อตั้งต้น (Stock culture) ลากบนอาหารในจานเพาะเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับ P. testosteroni และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ E. coli นาน 24 ชั่วโมง

2.6.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)

เขี่ยเชื้อ 2 ลูป (loop) จากจานเพาะเชื้อลงในอาหารเหลวสูตรอุดม 50 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับ P. testosteroni และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ E. coli ใช้ความเร็วของการเขย่า 110-120 รอบต่อนาที สำหรับเครื่องของบริษัท Heto นาน 10 ชั่วโมง

2.6.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เริ่มด้วยเชื้อตั้งต้น 5 เปอร์เซนต์ ใส่ในขวดรูปกรวยที่มีอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด ตามวิธีข้อ 2.3 ในอัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรขวด 1 ต่อ 5 บ่ม ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ E. coli และ 30 องศาเซลเซียส สำหรับ P. testosteroni พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 110-120 รอบต่อนาที

2.6.4 การติดตามการเจริญของเชื้อ

ทำได้ 3 แบบคือ

ก. การวัดความขุ่น โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectronic 20 D)

ข. การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) โดยเจือจางสารละลายของเชื้อในช่วง 10^2 - 10^7 เท่า ลงในจานเพาะเชื้อซึ่งมีอาหารสูตรอุดมบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับ P. testosteroni และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ E. coli นาน 24-30 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อด้วยเครื่องนับโคโลนี

ค. การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง (cell dry weight)

นำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 2.5 มิลลิลิตร ตามเวลาที่ต้องการ ปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยสารละลายนอร์มัลซาไลน์ 2 ครั้ง โดยใช้เซนตริฟิวส์ตั้งโต๊ะ

เครื่อง Minor 35 ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที กระจายเซลล์ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ด้วยปริมาตรเท่าเดิม ดูดสารละลายเซลล์ที่ล้างแล้วใส่ในถ้วยที่อบแห้งน้ำหนักคงที่ 2 ถ้วย ถ้วยละ 1 มิลลิลิตร อบในตู้อบ ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

2.7 วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์

นำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวตามเวลาที่ต้องการ ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใช้เครื่อง Beckman centrifuge J-21 C ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วยนอร์มัลซาไลน์ กระจายเซลล์ในสารละลายที่เหมาะสม ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) ที่ตั้งรอบการทำงานที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาทีต่อครั้ง จำนวน 2 ครั้ง

นำสารละลายที่ได้หลังจากทำให้เซลล์แตกไปเซนตริฟิวจ์ แยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้คือสารละลายเอนไซม์ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.8 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

ใช้วิธีทางสเปคโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) ดัดแปลงจากวิธีของ Macdonald และคณะ (1973)

2.8.1 ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น (Dehydrogenation reaction)

ใช้สารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.7 ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทกรดน้ำดี (bile acid) หรือเกลือน้ำดี (bile salt) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หรือ 7 หรือ 12 หรือ 17 ชนิดต่าง ๆ ได้แก่

กรดน้ำดี	ตำแหน่งคาร์บอนที่มี -OH
Lithocholic acid	3α
Chenodeoxycholic acid	3α, 7α
Deoxycholic acid	3α, 12α
cholic acid	3α, 7α, 12α
Sodium cholate	3α, 7α, 12α
Testosterone	17β
Androsterone	3α

ความเข้มข้นของกรดน้ำดีแต่ละชนิดในสารละลายปฏิกิริยาเท่ากับ 1.5×10^{-2} โมลาร์ มี NAD^+ เข้มข้น 2.50×10^{-3} โมลาร์ เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ในสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 9.5 ปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยาทั้งหมด 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส NAD^+ จะถูกเปลี่ยนเป็น NADH ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น ณ ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

กำหนดให้หน่วยของเอนไซม์ (unit) คือ ปริมาณไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นในสารละลายปฏิกิริยาต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

2.8.2 ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น (Hydrogenation reaction)

ใช้สารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.7 ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทกรดน้ำดีที่มีหมู่คีโต (Keto group) ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3, 7 และ 12 ได้แก่ กรดคีไฮโดรโคลิก มี NADH เข้มข้น 2.5×10^{-3} โมลาร์ เป็นโคเอนไซม์ ในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ที่พีเอช 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยาทั้งหมด 3 มิลลิลิตร NADH จะถูกเปลี่ยนเป็น NAD^+ วัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ลดลง ณ ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

กำหนด หนึ่งหน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณไมโครโมลของ NADH ที่ถูกใช้ไปในสารละลายปฏิกิริยาต่อนาที ภายใต้สภาวะของการทดลอง

2.8.3 การศึกษาชนิดของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคโพลีอะไครลาไมด์เจล

เตรียมสารละลายเอนไซม์ของแบคทีเรียตามวิธีข้อ 2.7 ลงในแท่งเจล 0.5×12 เซนติเมตร โดยดัดแปลงจาก Davis (1964) Weber and Osborn (1969) ใช้สารละลายเอนไซม์ซึ่งมีโปรตีนในช่วง 50-200 ไมโครกรัม หรือ 25-200 ไมโครลิตร นำไปแยกโดยใช้กระแสไฟ 3 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจล นาน 3 ชั่วโมง ในทริส-ไกลซีน บัฟเฟอร์ พีเอช 8.3 เจลที่ได้นำไปศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีน ดังนี้

นำแท่งเจลที่ได้ไปผ่าตามยาวออกเป็น 2 ซีก (บางกรณีใช้เจลทั้งแท่ง) ซีกหนึ่งนำไปย้อมสีแอคติวิตี (activity staining) โดยใช้ฟีนาซีนเมทโธซัลเฟต และไนโตรบลูเตตราโซเลียม ตามวิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Davis (1964) และ Gabriel (1971) โดยใช้สารละลายต่อไปนี้

0.03 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) พีเอช 9.2 25 มล.

0.003 โมลาร์ กรดน้ำดี (bile acid) 0.5 มล.

0.006 โมลาร์ นิโคตินาไมด์ อะดีโนซีน ไดนิวคลีโอไทด์ (NAD^+) 0.5 มล.

1 มก./มล. ฟีนาซีน เมทโธซัลเฟต (Phenazine methosulfate) 2.5 มล.

1 มก./มล. ไนโตรบลู เตตราโซเลียม (Nitroblue tetrazolium) 1.5 มล.

รวมกันปริมาตรสุดท้าย 30 มิลลิลิตร

แช่แท่งโพลีอะไครละไมด์เจลลงไป เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นแถบสีฟ้าม่วงเกิดขึ้นเต็มที่ นำมาล้างด้วย 7 เปอร์เซนต์กรดอะซีติก 1-2 ครั้ง เก็บได้นาน 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อีกชีกหนึ่ง (บางกรณีใช้เจลทั้งแท่ง) นำไปตัดด้วยใบมีดโกนตามขวาง ขนาดยาวชิ้นละ 0.5 เซนติเมตร บดละเอียดใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0, 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตี ตามวิธีข้อ 2.8.1

2.9 การวิเคราะห์โปรตีน

ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry และคณะ (Lowry และคณะ 1951)

2.9.1 การวัดปริมาณโปรตีนสุทธิของเซลล์

ไฮโดรไลซ์เซลล์ E. coli หรือ P. testosteroni ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเซลล์ที่ใช้ ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที สารละลายที่ได้เรียกว่า ไฮโดรไลเซต (hydrolysate)

เติม 0.1 มิลลิลิตรของไฮโดรไลเซต ลงในสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ ตามวิธีข้อ 2.4.1 3 มิลลิลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ ตามวิธีข้อ 2.4.2 0.3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที วัดการดูดกลืนของสารละลายสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานซึ่งได้จากอัลบูมินของซีรัมวัว (Bovine serum albumin)

2.9.2 การวัดปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์

วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ โดยเจือจางสารละลายโปรตีนลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมแล้วใช้สารละลาย 0.1 มิลลิลิตร ดำเนินการตามวิธีข้อ 2.9.1

2.10 วิธีการตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

แบ่งออกเป็น 2 วิธี ตามชนิดของสารตรึงเซลล์ที่ใช้

2.10.1 แคปปา-คาร์ราจีแนน และวุ้น (Kappa-carragenan and agar)

ดัดแปลงจากวิธีของจันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 2529)

2.10.1.1 การเตรียมสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน และวุ้น

ละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.5 เปอร์เซนต์ และวุ้น 1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ 15 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องอบฆ่าเชื้อ (auto-clave) ที่ความดัน 1 บรรยากาศ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส

2.10.1.2 วิธีการตรึงเซลล์ (Cell-Immobilization)

ดัดแปลงจากวิธีของ Nilsson และคณะ (Nilsson และคณะ, 1983) ผสมเซลล์ E. coli หรือ P. testosteroni (ATCC 11996) กับสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน ในบีกเกอร์ให้ได้เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามที่ต้องการ โดยมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 มิลลิลิตร นำไปกวนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 45-50 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่ความเร็วเหมาะสม นาน 1 นาที จนส่วนผสมเข้ากันดี ผสมนอร์มัล-บิวทิลอะซีเตท (n-Butyl acetate) ปริมาตรเท่ากัน (20 มิลลิลิตร) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วกวนต่อไปบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กด้วยความเร็วที่เหมาะสม จนกระทั่งมองเห็นการเกิดเม็ดอย่างสม่ำเสมอ (ใช้เวลาไม่เกิน 3 นาที) รีบเทนอร์มัล-บิวทิลอะซีเตทที่เย็น (0-4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรเดิม (40 มิลลิลิตร) กวนต่อไปอีก 30 วินาที จะได้เซลล์ตรึง (immobilized cell) ที่เป็นเม็ดเจล ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะรูปทรงกลม นำไปกรองด้วยตะแกรงไนล่อน ล้างด้วย 0.3 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ที่เย็น (0-10 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ประมาณ 3 ครั้ง จนหมดกลิ่นนอร์มัล-บิวทิลอะซีเตท เซลล์ตรึงที่ได้เก็บแช่ไว้ใน 0.3 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 4 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

2.10.2 แอลจิเนต (Alginate)

ดัดแปลงจาก Ohlson และคณะ (Ohlson และคณะ, 1979)

2.10.2.1 การเตรียมสารละลายแอลจิเนต

ละลายแอลจิเนต 1.33 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดัน 1 บรรยากาศ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.10.2.2 วิธีการตรึงเซลล์

ผสมเซลล์ E. coli หรือ P. testosteroni (ATCC 11996) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับสารละลายแอลจิเนต 15 มิลลิลิตร ให้ได้เปอร์เซนต์ (น้ำหนักเซลล์ต่อปริมาตรแอลจิเนต) ตามที่ต้องการ หยดสารละลายที่ได้ผ่านเข็มฉีดยาขนาดเบอร์ 21G-1½" (ควบคุมความเร็วของการหยดโดยใช้เครื่อง peristatic pump) ลงในบีกเกอร์ที่มี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลา สารผสมของเซลล์และแอลจิเนต เมื่อสัมผัสถูกสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ก็จะแข็งตัวเป็นเม็ดกลมของเจล เซลล์ตรึงที่ได้เก็บแช่ไว้ใน 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้

2.11 วิธีการศึกษาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี

2.11.1 การสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี

บ่มเซลล์ หรือเซลล์ตรึง E. coli และหรือ P. testosteroni กับกรดดีไฮโดรโคลิก (ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร) ในสารละลายปฏิกิริยาทั้งหมด 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่ต้องการ ดูดสารละลายปฏิกิริยามา 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือ 1 โมลาร์ 0.4 มิลลิลิตร และสารละลายเทสโทสเทอโรน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 15 วินาที หลังจากนั้นเติมเอทธิล-อะซิเตท 5 มิลลิลิตร เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่า 1 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ตั้งโต๊ะ ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบน (เอทธิลอะซีเตท) แยกออกมาเติม โซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส ประมาณ 1 กรัม เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใส นำไประเหยให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ละลายสารที่ได้ด้วยเมทานอล นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดน้ำดี

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 การตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยแคลเซียมแอลจิเนต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.11.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก

ปริมาณของกรดดีไฮโดรโคลิก และอนุพันธ์รวมทั้งกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาในข้อ 2.11.1 ติดตามวัดได้ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sawada และคณะ (1980) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และกรดดีไฮโดรโคลิกบริสุทธิ์ โดยมีเทสโทสเทอโรน เป็นสารมาตรฐาน (internal standard)

Column size ; 4.6 x 250 mm

Absorbent ; Dupont Zorbax, ODS

Mobile phase ; 0.05 M KH_2PO_4 : Acetic acid : Methanol (30: 0.05: 70 by volume), pH 3

Flow rate ; 1 ml/min.

Detector ; UV monitor at 208 nm

โดยวิธีนี้ เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ มีค่าดังนี้

กรดดีไฮโดรโคลิก	4.9 นาที
กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก	7.8 นาที
กรดโคลิก	12 นาที
เทสโทสเทอโรน	8.8 นาที
กรด 7, 12-ไดคีโตลิโทโคลิก	5.4 นาที
กรด 3, 12-ไดคีโตโคลิก	5.8 นาที

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์รายงานผลการทดลองเป็น 2 แบบคือ

2.11.2.1 แบบที่ 1

ในกรณีเปรียบเทียบรูปแบบของการสังเคราะห์กรดน้ำดีและอนุพันธ์ รายงานผลเป็นค่า

$$\text{เปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟกรดน้ำดีในโครมาโตแกรม}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน}} \times 100$$

(หมายเหตุ การวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำดีทุกครั้ง ใช้ปริมาณสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรนคงที่ 3.5×10^{-7} โมล)

2.11.2.2 แบบที่ 2

รายงานเป็นค่าไมโครโมลของกรดดีไฮโดรโคลิก หรือ กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งคำนวณได้จากเส้นกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 4 และ 5) เมื่อใช้สารมาตรฐานกรดดีไฮโดรโคลิก และกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยวิธีการและสภาวะเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดน้ำดีชนิดอื่น ๆ ในสารละลายปฏิกิริยา

2.11.3 การวิเคราะห์ชนิดของกรดน้ำดี

การศึกษายืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของกรดดีไฮโดรโคลิก กับ E. coli และ P. testosteroni (ATCC 11996) เป็นกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ทำได้โดยการเติมสารมาตรฐานกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ลงในสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งเตรียมได้ตามวิธีข้อ 2.11.1 แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธี 2.11.2 เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และกรดดีไฮโดรโคลิกบริสุทธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย