บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือ

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark
- เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่อุณหภูมิต่ำ (Refrigerated centrifuge) บริษัท Beckman Instrument Inc, U.S.A.
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท Charles Hearson Co., Ltd., England
- เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Hirayama Manufacturing Corperation, Japan
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath) บริษัท Heto lab equipment, Denmark
- ตู้ "ISSCO" Laminar Flow Model BVT-124 บริษัท International Scientific supply, Co., Ltd., U.S.A.
- หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TUV 15w/G 15 T8 บริษัท Philips, Holland
- เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) MS-90 No. 341659 บริษัท Fargo Instrument Ltd., Taiwan
- เครื่องเขย่า (Vortex) Model K550- GE บริษัท Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y. 11716, U.S.A.
- เครื่องชั่งสาร Sartorius บริษัท Scientific Promotion Co., Ltd.
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope)JSM- 35 CF บริษัท JEOL, Japan
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงผ่านตัวอย่าง (Transmission Electron Microscope) JEM-200 CX บริษัท JEOL, Japan
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography แบบ LC-3A บริษัท Shimadzu , Japan

2.2 เคมีภัณฑ์

- สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

Bovine Serum Albumin fraction V

Coomassie brilliant blue G-250

Coomassie brilliant blue R-250

β-Cyclodextrin

N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG)

Soluble starch (potato)

-สารเคมีจากบริษัท BDH Laboratory Chemical Division, England

Trichloroethylene

-สารเคมีจากบริษัท BBL, Bocton Dickinson Company, U.S. A.

Noble agar

สารเคมีทั่วไปชนิดอื่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารเกรดวิเคราะห์ทั้งหมด ยกเว้น Acetronitrile เป็นเกรด HPLC จากบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A., บริษัท Difco Laboratories, U.S.A., บริษัท BDH Laboratory Chemical Division, England, บริษัท Merck, Germany และบริษัท Fluka A.G. Buchs S.G., Switzerland สำหรับแป้งข้าวเจ้า (ตราช้างสามเศียร) และแป้งข้าวโพด (ตรา Maizena) เป็นแป้งสำหรับใช้ในการประกอบอาหาร ซื้อจากร้านค้าทั่วไป

2.3 วัสดุชีวภาพ

2.3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Bacillus sp. A11 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987)

2.3.2 แอนติซีรั่ม

เป็นส่วนซีรั่มจากเลือดของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนคือเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (จิราพร โรจน์ทินกร,2537) ซึ่งเก็บแช่แข็งไว้ที่ -80°ซ

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

2.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
NaCl	2	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Soluble starch (Fluka)	10	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ้าต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเติม Bacto agar 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

2.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1971, อุไรวรรณ รัชธร, 2536)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Starch (แป้งข้าวเจ้า)	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
Na_2CO_3	7.5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 10.1 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2.5 การเตรียมสารละลาย

2.5.1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของ CGTase

2.5.1.1 สารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์

ละลายโปแตสเซียมอะซีเตต (CH_3COOK) 1.96 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายด้วยกรดอะซีติก 0.2 โมลาร์ จนได้ pH 3,4 หรือ 5 ตามต้องการแล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2.5.1.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6

ละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 2.27 กรัม และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.58 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5.1.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 7

ละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.9 กรัม และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 2.32 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5.1.4 สารละลายทรีส- ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์

ละลายทรีส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน (Tris(hydroxymethyl)-amino methane) 2.42 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ ให้เป็น 8 หรือ 9 ตามต้องการ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.5.1.5 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 10

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต(Na_2CO_3) 0.69 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอเนต($NaHCO_3$) 1.14 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5.1.6 สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ pH 11

ละลายไกลซีน 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ จนได้ pH 11 ตามต้องการ

2.5.1.7 สารละลายแป้งมาตรฐาน

ละลายแป้ง (Soluble starch,potato) 0.2 หรือ 2.0 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนสารละลายเดือด ทิ้งให้เย็นก่อนใช้

2.5.1.8 สารละลายไอโอดีน

ละลายไอโอดีน 0.2 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา เมื่อต้องการใช้ให้เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 10

2.5.2 สารละลายสำหรับทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG

การเตรียม stock solution ของ NTG

โดยการชั่งสาร NTG 0.001 กรัม ละลายในสารละลายทรีส(ไฮดรอกซีเมทธิล) อะมิโนมีเธน-มาเลตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร

2.5.2.1 สารละลายทรีส(ไฮดรอกซีเมทธิล)อะมิโนมีเธน มาเลตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8

ชั่งทรีส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 12.1 กรัม ผสมกับกรดมาลิอิก 11.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนำไปปรับ pH เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บบรรจุใส่ขวด

2.5.2.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5.3 สารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 มิลลิกรัมในเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ 50 มิลลิลิตร และกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ (w/v) 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง แล้วเก็บในขวดสีชา

2.5.4 สารละลายสำหรับการทำ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน

2.5.4.1 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์

ละลายทริส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 1.21 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 1.47 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.5.5 สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ (Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)

2.5.5.1 สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (Electrophoresis buffer)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมีโนมีเธน 3 กรัม และไกลซีน 14.4 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.5.5.2 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 (4x Separating buffer, pH 8.8)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมีโนมีเธน 18.2 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.5.5.3 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.8 (4x Stacking buffer, pH 6.8)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมีโนมีเธน 6 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.5.5.4 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide stock solution)

ชั่งอะคริลาไมด์ 30 กรัม และ บิส-อะคริลาไมด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.5.5.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้เตรียมใหม่ ๆ ทุกครั้งที่ใช้

2.5.5.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (5x Sample buffer)

ผสมทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ pH 6.8 3.1 มิลลิลิตร, โบรโมฟีนอลบลู 1 เปอร์เซนต์ 0.5 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 10มิลลิลิตร

2.5.5.7 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

ละลาย Coomassie brilliant blue R-250 1 กรัม ในเมธานอล 450 มิลลิลิตร เติมกรดอะซีติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.5.5.8 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

ผสมเมธานอล 100 มิลลิลิตร และกรดอะซีติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

2.5.6 สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

2.5.6.1 สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (Electrophoresis buffer)

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.1 แต่ให้เติม SDS 0.1 เปอร์เซนต์ (w/v)

2.5.6.2 สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 8.8 (4x Separating buffer)

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.2 แต่ให้เติม SDS 0.4 เปอร์เซนต์ (w/v)

2.5.6.3 สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 6.8 (4x Stacking buffer)

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.3 แต่ให้เติม SDS 0.4 เปอร์เซนต์ (w/v)

2.5.6.4 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide stock solution)

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.4

2.5.6.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.5

2.5.6.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (5x Sample buffer)

ผสมทริส - คลอไรด์บัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ pH 6.8 0.6 มิลลิลิตร, โบรโมฟีนอลบลู 1 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร, กลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร, SDS 10 เปอร์เซนต์ 2 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

2.5.6.7 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.7

2.5.6.8 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.8

2.5.7 สารละลายสำหรับการหาความจำเพาะของแอนติบอดี

2.5.7.1 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เตรียมเหมือนข้อ 2.5.4.1

2.5.7.2 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.7

2.5.7.3 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.5.8

2.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.6.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

เก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองโดยเขี่ยเชื้อ 1 loop จากอาหารเหลว Medium I ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I ชนิดแข็งในหลอดทดลอง บ่มไว้ในตู้ควบคุม อุณหภูมิที่ 37° ซ เป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายไปเก็บจุลินทรีย์ที่ 4 °ซ และทำการถ่ายเชื้อทุกเดือน

2.6.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เลี้ยงแบคทีเรียในหลอดทดลองที่บรรจุ Medium I ประมาณ 4-6 ชั่วโมง เมื่อเจริญเต็มที่แล้วผสมกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ เทปิดทับผิวหน้า 1-2 เซนติเมตร ปิดจุกพันด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่ -20°ซ เก็บได้นานประมาณ 1 ปี

2.7 การเลี้ยงเชื้อและศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์

2.7.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Inoculum preparation)

เขี่ยเชื้อจาก agar slant 1 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I อยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37° ซ รอจนสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่ 420 นาโนเมตร ได้ค่าประมาณ 0.3-0.5 หน่วย

2.7.2 การเพาะและติดตามการเจริญของจุลินทรีย์

ใส่ Inoculum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi ที่ปรับปรุงแล้ว (อุไรวรรณ,2536) 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างไปวัดการเจริญของ แบคทีเรีย โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนน้ำใสคือ สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ไปวัดแอคติวิตี ส่วนตะกอนเซลล์ล้างด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

2.7.3 การวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ *Bacillus sp.* A11

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการทดลองข้อ 2.7.2 โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง

2.8 การชักนำ *Bacillus sp.* A11 ให้เกิดการกลายพันธุ์

2.8.1 การกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

นำ single colony ที่เลี้ยงด้วย Medium I agar ใน plate มาเลี้ยงใน Medium I ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi 250 มิลลิลิตร ใช้ 1 % inoculum size บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) และเซลล์ (wild type) ที่ตกตะกอน นำเซลล์มาล้างด้วย 0.85 เปอร์เซนต์โซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้ง เจือจางสารละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง ให้ได้ประมาณ 0.7 เป็นสารละลายเซลล์แขวนลอยที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์เนื่องจากมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

นำสารละลายเซลล์แขวนลอยที่ได้มาทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายเซลล์แขวนลอย 20 มิลลิลิตร ปิเปตใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งข้างในจานเพาะเลี้ยงเชื้อมี Magnetic bar นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ไปวางบน Magnetic stirrer ซึ่งใส่ไว้ใน UV Box ระยะห่างระหว่างหลอด UV และจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 ซม. ปรับให้ Magnetic bar หมุนช้า ๆ จากนั้นฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร) เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรทุก ๆ 5, 10 วินาที จนกระทั่งถึง 120 วินาที โดยสารละลายตัวอย่างที่ปิเปตนำมาเก็บในหลอดที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9.0 มล.เป็นการเจือจาง 10^{-1} เท่า นำหลอดตัวอย่างไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการเจือจางให้เหมาะสมเพื่อกระจายเชื้อบนอาหารวุ้นแข็ง Horikoshi นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ในช่วงการเจือจางและการกระจายเซลล์ตลอดจนการบ่มทำในที่มืด) นับเซลล์ที่รอดหลังจากถูกฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ และหาเปอร์เซนต์การอยู่รอด นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีทดลองในข้อ 2.9

2.8.2 การกลายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ด้วยสารเคมี NTG

(N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine)

เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.7.1 และ 2.7.2 เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงกลางของ Log phase ซึ่งใช้เวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ทำการกระจายอีกครั้งด้วยทรีส-กรดมาลิอิกบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.7 ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

นำสารละลาย NTG ในทรีสกรดมาลิอิกบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8 เติมลงในสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตรให้มีความเข้มข้นของ NTG เป็น 5-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มิลลิลิตรที่ได้ลงบนอาหารวุ้นแข็ง Horikoshi ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่รอด คำนวณเปอร์เซนต์การรอด นำโคโลนีที่เจริญไปทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ตามวิธีทดลองในข้อ 2.9

2.9 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย

2.9.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary Screening)

เขี่ยเชื้อ *Bacillus sp.* A11 ที่ทำการกลายพันธุ์จากข้อ 2.8 เลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็ง Horikoshi ที่ประกอบด้วย 1% starch โดยใช้เทคนิค point inoculation บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 3 วัน นำมาวัดความกว้างวงใสรอบโคโลนีของเชื้อหรือเรียกว่า Clear zone ภาคผนวก) คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่า Clear zone มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น นำมาคัดเลือกต่อตามวิธีข้อ 2.9.2

2.9.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (Secondary Screening)

การวัดแอคติวิตี CGTase

2.9.2.1 Dextrinizing activity (Iodine method)

ดัดแปลงจากวิธีของ Fuwa(1954)

เติมสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายแป้ง (soluble starch,potato) 0.2 เปอร์เซนต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม iodine reagent 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

หลอดควบคุม(control) ให้ใส่เอนไซม์ภายหลังการเติมกรดไฮโดรคลอริก

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินของสารประกอบแป้ง-ไอโอดีนลดลง 10 เปอร์เซนต์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

2.9.2.2 Cyclodextrin-trichloroethylene assay

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1986)

นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ (1:2, 1:4, 1:8, ...1:2^n) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายแป้ง (soluble starch, potato) ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเติมสารละลายไตรคลอโรเอธิลีน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 12 ชั่วโมง บันทึกผลการเกิดตะกอน Cyclodextrin-trichloroethylene complex เป็นค่า dilution limit (1:2^n)

กำหนดให้ dilution limit (1:2^n)คือ 1:2, 1:4, 1:8,....1:2^n เป็นค่าที่สารละลายเอนไซม์เจือจางมากที่สุดที่สังเกตเห็นตะกอนขาว ที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นสารละลายแป้งและสารไตรคลอโรเอธิลีนได้

2.10 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำตามวิธี standard method ของ Bradford (1976)

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน (protein reagent) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 5-60 นาที ภายหลังการเติมสารละลาย

สำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin fraction V (ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร)

2.11 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.11.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ประกอบด้วย glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, α-, β-, และ γ-CD ตามลำดับ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น

2.11.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.11.2.1 เตรียมจากตะกอนที่ได้จาก CD-TCE assay

นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย TCE (ข้อ 2.9.2.2) มาละลายในน้ำ กลั่นปริมาตร 0.5 -1.0 มล.แล้วต้มใน water bath อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลา 5-10 นาที จนตะกอนละลายหมด จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45 μm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

2.11.2.2 เตรียมจาก reaction mixture

นำ reaction mixture ที่เตรียมในช่วงต้นเหมือนข้อ 2.9.2.2 แต่ไม่ต้องเติม TCE มาต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45 μm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

2.11.3 สภาวะในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ ใช้ Supelco-NH_2 column ขนาด 4.6 x 250 mm. ใช้สารละลายผสม acetonitrile:water อัตราส่วน 75:25 (โดยปริมาตร) อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ RI เป็น detector ฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ในปริมาตรอย่างละ 5 - 20 ไมโครลิตร ส่วนในกรณีการทำ internal standard จะผสมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC จำนวน 40 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินในสารละลายโดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α-, β- และ γ-CD มาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน และฉีดเข้าเครื่องด้วยวิธีและสภาวะเดียวกัน

2.12 การทำ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน

ทำตามวิธีของ พรชัย แซ่กิม (2539)

นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเติมแป้งข้าวโพด(ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 120°ซ เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนใช้) 5 เปอร์เซนต์ (w/v) คนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนแป้งด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5,000รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำตะกอนแป้งมาล้างด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง แล้วชะเอนไซม์ออกจากแป้งด้วยการกวนในสารละลายมอลโตส 0.2 โมลาร์ ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที (ใช้สารละลายมอลโตสปริมาตร 125 มิลลิลิตรในแต่ละครั้งที่ล้างถ้าเริ่มจาก crude enzyme 1 ลิตร) ปั่นแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยการทำ ultrafiltration

2.13 การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

2.13.1. การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ (Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)

ทำตามวิธีของ Davis (1964)

2.13.1.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 10 เปอร์เซนต์

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ข้อ 2.5.5.4) 6.8 มิลลิลิตร ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 (ข้อ 2.5.5.2) 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 8.2 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติม TEMED 10 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ (ข้อ 2.5.5.5) 100 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล (gel mold) ซึ่งเป็นแผ่นกระจกสี่เหลี่ยมขนาด 8.3x10.1 เซนติเมตร วางขนานห่างกัน 1.5 มิลลิเมตร จนกระทั่งสารละลายมีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร (ห่างจากขอบบน 2.3 เซนติเมตร) ค่อย ๆ

หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน จึงเทน้ำออกจากผิวหน้าเจล

เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ข้อ 2.5.5.4) 1.35 มิลลิลิตร ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.8 (ข้อ 2.5.5.3) 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 4.6 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติม TEMED 10 ไมโครลิตร และ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ (ข้อ 2.5.5.5) 60 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วเท stacking gel ลงในแบบเจลให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิเมตร ใส่หวี (comb) ไล่ฟองอากาศออก ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตุเห็นเจลแข็งแล้วค่อย ๆ ดึง comb ออก แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.13.1.2 การเตรียมสารละลายโปรตีน

นำสารละลายโปรตีน มาเติมบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ข้อ 2.5.5.6) ในอัตราส่วน 5:1 เขย่าให้เข้ากัน แล้วหยอดส่วนผสมนี้ลงบนหลุมเจลที่เตรียมไว้ ให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัม/หลุม

2.13.1.3 การทำอิเลคโทรโฟรีซิส

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ (ข้อ 2.5.5.1) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นบนและชั้นล่างให้ท่วมปลายทั้งสองข้าง ของแผ่นเจล หยอดสารละลายโปรตีน (ข้อ 2.13.1.2) ลงบนหลุมเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 20 มิลลิแอมแปร์ต่อแผ่นเจล ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งแถบสี (tracking dye) เคลื่อนที่ไปอยู่ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 5 มิลลิเมตร จึงปิดกระแสไฟฟ้า

2.13.1.4 การติดตามแถบโปรตีน

2.13.1.4.1 Coomassie blue staining

นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมโปรตีน (ข้อ 2.5.5.7) เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออก ด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (ข้อ 2.5.5.8) หลายครั้ง จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอย่างชัดเจน

2.13.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส
(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
ทำตามวิธีของ Laemmli (1970)

2.13.2.1 การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์เจล 10 เปอร์เซนต์

เตรียมเหมือนข้อ 2.13.1.1 แต่ใช้สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

2.13.2.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ที่ต้องการวิเคราะห์

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือสารละลายผสมของ โอวัลบูมิน (Ovalbumin), อัลบูมิน (Bovine serum albumin), ฟอสฟอริลเรส บี (Phosphorylase B) เบตา-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) และไมโอซิน (Myosin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000, 66,200, 97,400, 116,250 และ 200,000 ดาลตัน ตามลำดับ

ละลายโปรตีนมาตรฐานในบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ข้อ 2.5.6.6) ในอัตราส่วน 1 : 20 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ โดยนำไปผสมกับบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ข้อ 2.5.6.6) ในอัตราส่วน 5 : 1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใส่ ในช่องบนเจลที่เตรียมไว้ โดยให้มีปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างอยู่ในช่วง 2-20 ไมโครกรัมต่อช่องเจล

2.13.2.3 การทำอิเลคโทรโฟรีซิส

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างใน (ข้อ 2.13.2.2) มาทำอิเลคโทรโฟรีซิส โดยทำเช่นเดียวกับการทำอิเลคโทรโฟรีซิสใน (ข้อ 1.3) แต่ใช้ทริส-เอสดีเอส อิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ข้อ 2.5.6.1) แทนทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

2.13.2.4 การติดตามแถบโปรตีน

นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก นำมาย้อมสีโปรตีนตามวิธี (ข้อ 2.13.1.4.1)

2.14 การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.9.2 แต่เปลี่ยนสภาวะการทดลองจาก pH 6.0 เป็น pH 3.0-11.0 (ใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ในข้อ 2.5.1.1-2.5.1.6) และเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 40°ซ เป็น 30-70 °ซ

2.15 การศึกษาการผลิต CGTase ของเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ถ่ายเชื้อที่เก็บไว้ที่ -20°ซ ในอาหารเหลว Medium I ที่มี 50% กลีเซอรอล โดยเขี่ยเชื้อ 1 loop ใส่ลงบนอาหารแข็ง Medium I ในจานเพาะเลี้ยงทุกๆ 15 วัน ทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2,3,4 และ 5 หลังการถ่ายเชื้อทุกครั้ง บ่มที่ 37°ซ 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อจากจานเพาะเลี้ยง นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Horikoshi บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์และสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาหาแอคติวิตีของ CGTase ตามวิธีข้อ 2.9.2

2.16 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์

2.16.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย Transmission Electron Microscope (TEM) (เวคิน นพนิตย์,2529)

ตัวอย่างเซลล์ชนิดบาง เตรียมโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำแสงอิเล็กตรอน (Electron Beam) ผ่านทะลุได้ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

1. เพาะเลี้ยง *Bacillus sp.*A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 ในอาหารเหลว Horikoshi บ่มที่ 37 °ซ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm 10 นาที เก็บเซลล์ที่ตกตะกอนไว้

2. แช่ตัวอย่างเซลล์ (Pre-Fix) ที่ได้จากข้อ 1 ใน 3% Glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate Buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืนในตู้เย็น

3. ล้างด้วย Phosphate Buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

4. แช่ตัวอย่าง (Post-Fix) ใน 2% OsO_4 ใน 0.1 M Phosphate Buffer pH 7.2 หรือในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชั่วโมง

5. ดูดเอา OsO_4 ออกแล้วใส่ 35% Ethanol เพื่อล้างน้ำยาดอง OsO_4 และเริ่ม Dehydration ใช้เวลา 15 นาที

6. ขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydrate) ด้วย Ethanol หรือ Acetone ความเข้มข้น 70%, 95% ,100% (3 ครั้ง) และ Propylene oxide (2 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นละ 10-15 นาที

7. ใส่ตัวกลางสำหรับทำให้ตัวอย่างแข็งตัว เพื่อตัดทำ Block โดยใช้ Propylene Oxide และ Epon Embedding Media 60 นาที

8. Polymerization ที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

9. ติดตัวอย่างบนแผ่นตาข่าย (Grid) นำไปย้อมด้วย Lead Citrate หรือ Uranyl Acetate เพื่อเป็นการเพิ่ม Contrast ให้กับตัวอย่าง ล้างด้วยน้ำ ซับ Grid ให้แห้ง

10. นำไปส่องดูด้วย TEM

2.16.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาลักษณะเซลล์ด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) (เวคิน นพนิตย์,2529)

ตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาด้วย SEM จะต้องอยู่ในสภาพที่ปราศจากน้ำหรือความชื้นใด ๆ และมีสภาพผิวที่นำไฟฟ้า การเตรียมตัวอย่างมีดังนี้

1. เพาะเลี้ยง *Bacillus sp.*A11 และสายพันธุ์กลาย UNUN-97 บนอาหารแข็ง Horikoshi บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตัดอาหารแข็งบริเวณที่มีโคโลนีเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 ซ.ม. หนาไม่เกิน 0.5 ซ.ม.

2. แช่ตัวอย่าง (Pre-Fix) ใน 25% Glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate Buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืนในตู้เย็น

3. ล้างด้วย Phosphate Buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

4. แช่ตัวอย่าง (Post-Fix)ใน 1% OsO_4 ใน 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2 หรือในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชั่วโมง

5. ล้างด้วย Phosphate Buffer หรือน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

6. ขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydrate) ด้วย Ethanol หรือ Acetone ที่ความเข้มข้น 30%,50%,70%,80%,90% และ 100% (2 ครั้ง) ตามลำดับ ขั้นตอนละ 10-15 นาที

7. ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำให้แห้ง (Critical Point Dryer)

8. ติดตัวอย่างบนฐานรองตัวอย่าง (Stub) ด้วยเทป 2 หน้าหรือกาว

9. นำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (Ion Sputter) และส่องดูด้วย SEM