รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2541. สรุปภาวะการส่งออกอาหารแช่แข็งในปี 2540 และ 2541. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง 117 : 4.

บุญเสริม วิทยชำนาญกุล. 2540. โรคติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในบ่อเลี้ยง. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง. 105 : 2

ประเสริฐ ทองเจริญ. 2517. ยาต้านจุลชีพ. กรุงเทพฯ : อักษรสมัย, หน้า 10-12.

วรรนิภา เพี้ยนภักตร์. 2539. การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์, หน้า 158-191.

ภาษาอังกฤษ

Abraham, E. P., Heatley, N. G., Brookes, P., Fuller, A.T. and Walker, J. 1956. Probable Identity of an antibiotic produced by a spore-bearing bacillus of the *B. pumilus* group with micrococcin. Nature. (London) 178 : 44 – 45.

Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y. and Kurahashi, K. 1985. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacilllus subtilis* 168 : isolation, structural analysis, and biogenesis. Journal of Biochemistry (Tokyo). 98 : 585 – 603.

Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 1808 - 1815.

Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. 1984. Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilis* bacteriocin lactacin B. Antimicrob. Agents Chemother. 26 : 328 – 334.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Pathol. 45 : 493 - 496.

Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. J. Appl. Bacteriol. 70 : 25 – 30.

Bierbaum, G. and Sahl, H. G. 1991. Induction of autolysis of *Staphylococcus simulans* 22 by Pep5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes, In G. Jung and H. G. Sahl (eds.), Nisin and Novel Lantibiotics. pp. 386-396. Leiden : Escom Publishers.

Bierbaum, G. and Sahl, H. G. 1993. Lantibiotics-usually modified bacteriocin-like peptides from gram-positive bacteria. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A. 278 : 1-22.

Bruno, M. E. C. and Montrille, T. J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3003 – 3010.

Chikindas, M. L., García-Garcerá, M. J., Driessen, A. J. M., Ledeboer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Abee, T., Konings, W. N. and Venema, G. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophillic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3577 – 3584.

Christensen, P. P. and Hutkins, R. W. 1992. Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3312 – 3315.

Clarke, D. J., Robson, R. M. and Morris, J. G. 1975. Purification of two *Clostridium* bacteriocins by procedures appropriate to hydrophobic proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 7 : 256 – 264.

Dajani, A. S. and Taube, Z. 1974. Plasmid-mediated production of staphylococcin in bacteriophage type 71 *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 5 : 594 – 598.

Ellison, J. S. and Kautter, J. A. 1970. Purification and some properties of two boticins. J. Bacteriol. 104 : 19 – 26.

Farkas-Himsley, H., Zhang, Y. S., Yuan, M. and Musclow, C. E. 1992. Partially purified bacteriocin kills malignant cells by apoptosis : programmed cell death. Cell.Mol. Biol. 38 : 643 – 651.

Foulds, J. D. and Shemin, D. 1969. Concomitant synthesis of bacteriocin and bacteriocin inactivator from *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 99 : 661 – 666.

Francis, A. E. and Rippon J.E. 1949. *Bacillus polymyxa* and its bacteriophages. J. Gen. Microbiol. 3 : 425 –432.

Garver, K. I. and Muriana, P. M. 1994. Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat -stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2191-2195.

Gilmore, M. S., Dunny, G. M., Cleary, P. P. and McKay, L. L. 1991. *Enterococcus faecalis* Hemolysin/bacteriocin, In G. M. Dunny, P. P. Cleary and L. L. McKay (eds.), Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci. pp.206 – 213. Washington D. C. : American Society for Microbiology.

Goebel, W. F., Barry, G.T., Jesaitis, M. A. and Miller, E. M. 1955. Colicin K. Nature (London). 176 : 700 – 701.

Goldberg, H. S. 1958. ANTIBIOTICS : Their Chemical and Non – Medical Uses. pp. 57-62. Canada : Nostrand.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B. and Suarez, J. E. 1994. Detection, purification and partial Characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactocbacillus plantarum* strain of diary origin. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2158 - 2163.

Gross, E. and Morell, J. L. 1971. The structure of nisin. J. Am. Chem. Soc. 93 : 4634 - 4635.

Hale, E. M. and Hinsdill, R. D. 1973. Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462. Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 634 – 640.

Hamon, Y. and Person, Y. 1968. Sur la frequence des bacteries productrices de phages letaux. Distinction entre ces phages et les bacteriocines. Zentral bl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A. 206 : 439 - 444.

Harris, E. L. V. 1989. Concentration of the extract : precipitation by increasing the ionic strength (salting-out). In E. L. V. Harris and S. Angal (eds.), Protein Purification Methods : a practical approach. pp.154 – 157. New York : Oxford University Press.

Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J. Appl. Bacteriol. 173 : 7491 – 7500.

Hauge, S.1955. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. J. Appl. Bacteriol. 18 : 591 – 595.

Hawiger, J. 1968. Purification and properties of lysozyme produced by *Staphylococcus aureus* . J. Bacteriol. 95 : 376 – 384.

Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Gen. Microbiol. 138 : 2725 – 2731.

Hurst, A. 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27 : 85-123.

Ivánovics, G. and Alföldi, L. 1954. A new antibacterial principle : megacine. Nature. 4427 : 465.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive bacteria. Microbiol. Rev. 59 : 171-200.

Jansen, E. F. and Hirschmann, D. J. 1944. Subtilin – an antibacterial product of *Bacillus subtilis* : culturing conditions and properties. Archives of Biochemistry. 4 : 287 – 309.

Jetten, A. M. and Vogels, G. D. 1973. Characterization and extrachromosomal control of bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 49 – 57.

Jetten, A. M., Vogels, G. D. and De Windt, F. 1972. Production and purification of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. J. Bacteriol. 112 : 235 – 242.

Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R.M., Dezmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L. and Piard, J.C. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1416-1424.

Johnson, C. W., West, H. D., Jones, H. L. and Long, C. J. 1949. Biocerin : an antibiotic produced by *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 57 : 63 –65.

Johnson, E. A. 1990. *Bacillus cereus* food poisoning. In D. O. Cliver (ed.), Foodborne Disease. pp. 128 – 134. San Diego : Academic Press.

Kalchayanand, N., Hanilin, M. B. and Ray. B. 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin Lett. Appl. Microbiol. 15 : 239 – 243.

Kanatani, K., Oshimura, M. and Sano, K. 1995. Isolation and characterization of acidocin A clonig of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 48 : 1061 – 1067.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocin production by lactic acid bacteria. Biochemie. 70 : 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 39-86.

Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z. and Kurytowicz, W. 1978. Section C : Antibiotics isolated from the genus *Bacillus* (*Bacillaceae*). In T. Korzybski (ed.), Antibiotics origin,nature, and properties vol III. pp. 1529 – 1661. Washington D. C. : American Society for Microbiology.

Lewus, C.B., Sun, S. and Montville, T.J. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. Appl.Environ. Microbiol. 58 : 143-149.

Lowry, O. H., Rosebrough, A.L., Farr, A.L., and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.

Malke, H., Starke, R., Jacob, H. E. and Köhler, W. 1974. Bacteriocine-like activity of group A Streptococci due to the production of peroxide. J. Med. Microbiol. 7 : 367 – 374.

Murray, F. J., Tetrault, P. A., Kaufmann, O. W., Koffer, H., Peterson, D. H. and Collingsworth, D. R. 1949. Circulin, an antibiotic from and organism resembling *Bacillus circulans*. J. Bacteriol. 57 : 305 – 312.

Naclerio, G., Ricca, E., Sacco, M. and Felice, M.D. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 4313 - 4316.

Nissen-Meyer, J., Larsen, A.G., Sletten, K., Daeschel, M. and Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. J. Bacteriol. 174 : 5686-5692.

Novotny, J.F. Jr. and Perry, J.J. 1992. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 2393-2396.

Piard, J. C., Muriana, P. M., Desmazeaud, M. J. and Klaenhammer, T. R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine – containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis CNRZ 481. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 279 – 284.

Preneta, A. Z. 1989. Separation on the basis of size : gel permeation chromatography. In E. L. V. Harris and S. Angal (eds.), Protein Purification Methods : a practical approach. pp.293 - 304. New York : Oxford University Press.

Racusen, D. 1979. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. Analytical Biochemistry. 99 ; 474 – 476.

Ralston, D. J., Baer, B. S., Lieberman, M. and Krueger, A. P. 1955. Virolysin, a virus-Induced Lysin from staphylococcal phage lysates. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89 : 502 – 507.

Roe, S. 1989. Separation based on structure. In E. L. V. Harris and S. Angal (eds.), Protein Purification Methods : a practical approach. pp.200 - 214. New York : Oxford University Press.

Rogers, A. H. 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. Appl. Microbiol. 24 : 294 – 295.

Rogers, L. A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16 : 321-325.

Rogul, M. and Carr, S. R. 1972. Variable ammonia production among smooth and rough strains of *Pseudomonas pseudomallei* : resemblance to bacteriocin production. J. Bacteriol. 112 : 372 – 380.

Sahl, H. G. 1994. Staphylococcin 1580 is identical to the lantibiotic epidermin. Implications for the nature of bacteriocins from gram-positive bacteria. Appl. Environ. Microbiol.60 : 752 – 755.

Schindler, C. A.and Schuhardt, V. T. 1965. Purification and properties of lysostaphin – a lytic agent for *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Acta. 97 : 242 – 250.

Schögger, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine – sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry. 166 : 368 – 379.

Schlegel, R. and Slade, H. D. 1974. Alteration of macromolecular synthesis and membrane permeability by *Streptococcus sanguis* bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 81 : 275 – 277.

Shafia, F. 1966. Thermocins of *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. 95 : 524 – 525.

Sonstein, S. A., Hammel, J. M. and Bondi, A. 1971. Staphylococcal bacteriophage-associated lysin : a lytic agent active against *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol 107 : 499 – 504.

Stahl, S. 1989. A new bacteriocinogenic activity : megacin B 11 encoded by plasmid pSE 203 in strains of *Bacillus megaterium*. Archives of Microbiology. 151 : 159 – 165.

Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. and Klaenhammer, T. R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 3613 – 3615.

Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1975. Bacteriocin of a group B streptococcus : partial purification and characterization. Antimicrob. Agents Chemother. 7 : 764 – 722.

Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40 : 722-756.

Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. and Gray, E. D. 1973. Group A streptococcal bacteriocin. Production, purification and mode of action. J. Exp. Med. 138 : 1168 – 1183.

Tagg, J. R. and McGiven, A. R. 1972. Some possible autoimmune mechanisms in rheumatic carditis. Lancet. 2 : 686 – 688.

Tagg, J. R., Read, R. S. D. and McGiven, A. R. 1973. Bacteriocin of a group A streptococcus : partial purification and properties. Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 214 – 221.

Tramer, J. 1966. Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. Nature (London). 211 : 204 – 205.

Vater, J. 1989. Lipopeptides, an interesting class of microbial secondary metabolites. In U. P. Schlunegger (ed.) Biologically active molecules. pp. 27 – 38. Berlin : Springer-Verlag.

Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J. Leenhouts, K. J., Kok, J., Konings, W. N. and Venema, G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1041 – 1048.

Wadström, T. and Hisatsune, K. 1970. Bacteriolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. Purification of an endo-β-acetylglucosaminidase. Biochem. J. 120 : 725 – 734.

Walstad, D. L., Reitz, R. C. and Sparling, P. F. 1974. Growth inhibition among strains of *Neisseria gonorrhoeae* due to production of inhibitory free fatty acids and lysophosphatidylethanolamine : absence of bacteriocins. Infect. Immun. 10 : 481 – 488.

Yang, R., Johnson, M. C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3355 – 3359.

Zheng, G. and Slavik, M. F. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a Bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. Letters in Applied Microbiology. 28 : 363 – 367.

Zuber, P., Nakano, M. M., Marahiel, M. A. 1993. Peptide antibiotics. In L. S. Abraham (ed.), *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. pp. 897 – 916. Washington D. C. : American Society for Microbiology.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

1. อาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic Soy Broth) (1000 ml)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0 กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0 กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	2.5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5 กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที)

2. อาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic Soy Agar) (1000 ml)

อาหารเหลวทริปติกซอย	1000 ml
วุ้นผง	15 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที)

ภาคผนวก ข.

1. 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 (1000 ml)

0.5 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0	100 ml
น้ำกลั่น	900 ml

2. 0.5 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 (50 ml)

0.5 M สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	30.5 ml
0.5 M สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	19.5 ml

3. 0.015 M Tris – HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 (1000 ml)

Trisma Base	1.8166 กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	1000 ml

ชั่งสารดังข้างต้น เติมน้ำเกือบ 1000 ml แล้วปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วย 1 N HCl แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml

4. สารละลายอะคริลาไมด์ (50 ml)

อะคริลาไมด์ (acrylamide)	24 กรัม
N,N'-Methylene-bis-acrylamide	0.75 กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	50 ml

- เสถียรได้ถึง 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

5. Gel Buffer (100 ml)

Trizma Base	36.4 กรัม
Sodium Lauryl Sulfate	0.30 กรัม
พีเอช	8.45
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	100 ml

ละลายสารในน้ำกลั่น 60 ml แล้วปรับพีเอชให้ได้ 8.45 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 ml

6. สารละลาย 10% AMPS (แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต) ในน้ำกลั่น (1 ml)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	100 mg/ml

เตรียมก่อนใช้ทันที

7. Anode Buffer (500 ml)

Trizma Base	12.11 กรัม
พีเอช	8.9
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	500 ml

ละลาย Trizma Base 12.11 กรัม ในน้ำกลั่น 100 ml แล้วปรับพีเอชเป็น 8.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ml

8. Cathode Buffer (500 ml)

Trizma Base	6.055 กรัม
Tricine	8.96 กรัม
Sodium dodecyl sulfate	0.50 กรัม
พีเอช	8.2
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	500 ml

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นให้ปริมาตรใกล้เคียง 500 ml จะได้พีเอชประมาณ 8.2 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ml

9. สารละลาย 20% SDS (50 ml)

Sodium dodecyl sulfate	10 กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	50 ml

ละลายในน้ำอุ่น 50 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 อาทิตย์

10. สารละลาย 1 M Tris-HCl พีเอช 6.8 (100 ml)

Trizma Base	12.1 กรัม
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	100 ml
พีเอช	6.8

ละลาย Trizma Base ปริมาณข้างต้นด้วยน้ำกลั่น 80 ml ปรับพีเอชเป็น 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml

11. Sample Buffer (20 ml)

20% SDS	4.0 ml
Glycerol	2.4 ml
2-Mercaptoethanol	0.4 ml
Brilliant Blue G	2.0 mg
1 M Tris-HCl พีเอช 6.8	1.0 ml
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	20 ml

12. Fixative Solution สำหรับการย้อมโปรตีนด้วย Coomassie Blue G-250 และย้อม lipoprotein

10% (ปริมาตร/ปริมาตร) Formaldehyde

13. Staining Solution สำหรับการย้อมโปรตีนด้วย Coomassie Blue G-250 (200 ml)

Coomassie Brilliant Blue G-250	50 mg
สารละลายกรดอะซิติก 10% (ปริมาตร/ปริมาตร)	200 ml

ละลายและคนเป็นเวลา 30 นาทีแล้วกรองก่อนใช้

14. Destain Solution สำหรับการย้อมด้วย Coomassie Blue G-250 (1000 ml)

กรดอะซิติกเข้มข้น	100 ml
น้ำกลั่น	900 ml

15. Fixative Solution สำหรับการย้อม glycoprotein (100 ml)

Isopropanol	25 ml
กรดอะซิติกเข้มข้น	10 ml
น้ำกลั่น	65 ml

16. Staining Solution สำหรับการย้อม glycoprotein (100 ml)

Thymol	1 กรัม
Isopropanol	25 ml
กรดอะซิติกเข้มข้น	10 ml
น้ำ เติมให้ครบ	100 ml

17. Washing Solution สำหรัลการย้อม glycoprotein (100 ml)

กรดซัลฟูริกเข้มข้น	80 ml
เอธานอล	20 ml

18. Staining Solution สำหรับย้อม lipoprotein (100 ml)

1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) Sudan Black B ใน ethylene glycol

19. Destain Solution สำหรับการย้อม lipoprotein (100 ml)

อะซิโตน	20 ml
กรดอะซิติกเข้มข้น	15 ml
น้ำกลั่น เติมให้ครบ	65 ml

ภาคผนวก ค.

1. Separating Gel Solution (16.5%T, 3%C)

สารละลายอะคริลาไมด์	5 ml
Gel Buffer	5 ml
Glycerol	1.6 ml
น้ำกลั่น	3.4 ml
10% AMPS	50 µl
TEMED	5 µl

2. Stacking Gel Solution (4%T, 3%C)

สารละลายอะคริลาไมด์	0.2 ml
Gel Buffer	0.62 ml
น้ำกลั่น	1.68 ml
10% AMPS	20 µl
TEMED	2 µl

3. **การย้อม** glycoprotein

มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 นำเจลจากการทำ SDS-PAGE มาแช่ในสารละลาย 25% (ปริมาตร/ปริมาตร) isopropanol ใน 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติก เป็นเวลาข้ามคืน

3.2 ย้อมด้วยสารละลาย 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) thymol ใน 25% (ปริมาตร/ปริมาตร) isopropanol และ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติก เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง

3.3 ล้างด้วยสารละลาย 80% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดซัลฟูริคใน 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) เอธานอลเป็นเวลา 15-30 นาที สารที่เป็น glycoprotein จะค่อยๆ ปรากฎเป็นแถบสีส้มแดงเข้มจนเกือบเป็นสีน้ำตาล ทำการบันทึกผลทันที

4. การย้อม lipoprotein ด้วย Sudan Black B

มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1 แช่แผ่นเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ใน 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ฟอร์มัลดีไฮด์ เป็นเวลาข้ามคืน

4.2 แช่ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

4.3 แช่ใน ethylene glycol 2 ครั้ง ๆ ละ 20 นาที

4.4 แช่ในสารละลาย 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) Sudan Black B ใน ethylene glycol เป็นเวลาข้ามคืน

4.5 แช่ล้างด้วยสารละลาย 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) อะซีโตน ใน 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติก ทำการล้างซ้ำ จนแถบสีดำที่เกิดจากการติดสีของ lipoprotein ปรากฏชัดเจน แล้วบันทึกผล

5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

<u>สารละลาย A</u> ประกอบด้วย

2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต ($NaKC_4H_4O.4H_2O$)	2 ml
1.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	2 ml
2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในสารละลาย 0.1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์	196 ml

ผสมสารละลายทั้งสามให้เข้ากันตามปริมาตรที่กำหนด แล้วใช้ทันที ไม่ควรเตรียมไว้นาน

<u>สารละลาย B</u> (Phenol reagent)

เจือจาง Folin-Ciocalteu reagents (Lowry's reagent) ด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1 : 3 โดยปริมาตร

ขั้นตอนในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ก.การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. เตรียม Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ให้มีปริมาณ BSA ในแต่ละหลอดทดลองเป็น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 μg/0.1 ml

2. นำแต่ละหลอดจากข้อ 1. มาเติมสารละลาย A 3 ml ทิ้งไว้ 10 นาที จึงเติมสารละลาย B 0.3 ml ทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกผล

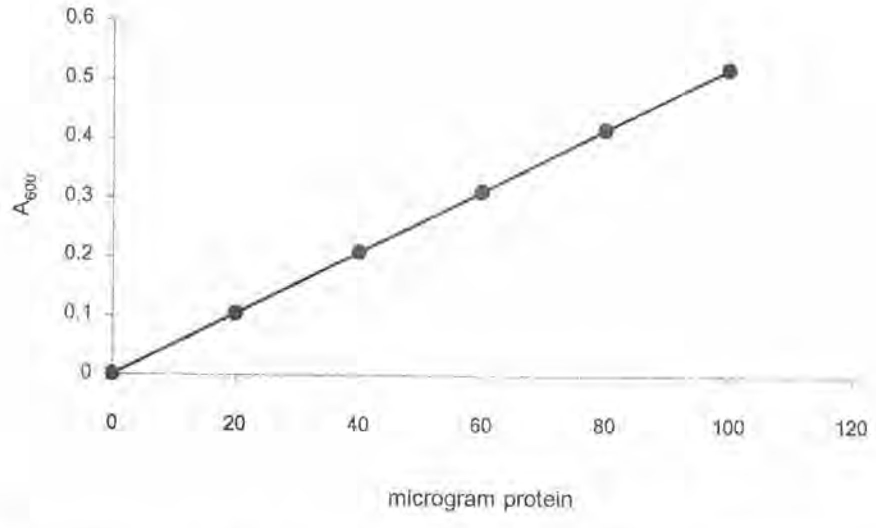
3.สร้างกราฟระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

ข. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

1. นำสารละลายตัวอย่างมา 0.1 ml

2. เติมสารละลาย A 3 ml ทิ้งไว้ 10 นาที จึงเติมสารละลาย B 0.3 ml แล้วทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

3. เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานเพื่อทราบปริมาณโปรตีน



รูปที่ 32 : กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนิโลบล พรหมประสิทธิ์ เกิดวันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2516 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2540