บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และ วิธีการทดลอง

1. <u>เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น AG แบบ KF-4 ของบริษัท Infors, Switzerland

1.2 เครื่องเหวี่ยงแยกควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota, Japan

1.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น G-86 ของบริษัท New Brunswick scientific Co.,Inc. USA

1.4 เครื่องเหวี่ยงแยกปริมาตรน้อย (High speed microcentrifuge) รุ่น MC-15A ของบริษัท Tomy Seiko Co.,Ltd. Tokyo Japan

1.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รุ่น UV-3100 ของบริษัท Shimadzu, Japan

1.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น spectronic 21 ของบริษัท Baush & Lomb, USA

1.7 เครื่องวัดค่าความเข้ม (densitometer) ของบริษัท LKB Bromma

1.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น PH/mV-506 ของบริษัท Crison, Spain

1.9 ตู้อบสูญญากาศ (vacuum) ของบริษัท Shimizu, Japan

1.10 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden

1.11 เจลแชมเบอร์

1.12 แหล่งกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต ของบริษัท LKB, Sweden

1.13 กล้องถ่ายรูป (Kodak) และฟิล์ม Tri-X pan

2. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 ไลโซไซม์ (Lysozyme grade I) ไรโบนิวคลีเอส(RNase)โปรเนส (Pronase) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulphate : specially pure grade) ฟีนอล (Phenol AR grade) เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) อะกาโรส (Agarose type I-A) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

2.2 เรสตริกชันเอนไซม์ ได้แก่ BamHI,PstI,BglII,EcoRI ของบริษัท Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc. BRL, USA

2.3 อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของบริษัท E.Merck, German

2.4 กากรำข้าว ของบริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด

2.5 ไซแลนจากเบลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan)ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

2.6 น้ำตาลไซโลส (D-xylose)ของบริษัท Sigma Chemical Co.,USA

2.7 กรดซัลฟุริก ของ Malinkrodt, USA

2.8 ดีอีเออี เซฟาเดกซ์ เอ 50 (DEAE Sephadex A-50) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden

2.9 บิส อะคริลาไมด์ (N,N-methylene bis acrylamide) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

2.10 TEMED ของบริษัท Fluka, Switzerland

2.11 สีคูแมสซี บลู จี 250(Coomassie brilliant blue G-250) และสีโบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue) ของบริษัท E.Merck, German

2.12 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulphate) ของบริษัท May & Baker Ltd, Dagenham, England

2.13 ไกลซีน (Glycine chromatographically homogeneous) ของบริษัท BDH Chemical Ltd, Poole, England

2.14 อัลบูมิน (Fraction V,96-99% albumin,bovine) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA

3. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

*Streptomyces sp.*190-1 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและต้านทานยาเททราซัยคลิน

*Streptomyces sp.*42-9 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสและต้านทานยาแอมพิซิลลิน

ตารางที่ 1 *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆ

สายพันธุ์, รหัสของลูกผสม	แหล่งที่มา	ลักษณะทางกายภาพ	อ้างอิง
*Streptomyces sp.*190-1	แหล่งดินในประเทศไทย	สปอร์มีสีน้ำตาลเทา เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ(ภาคผนวกที่ ก1) เป็นสีน้ำตาลดำ	นถมล ศุภจรรยา, 2526
*Streptomyces sp.*42-9	แหล่งดินในประเทศไทย	สปอร์มีสีน้ำตาลด้านหลังโคโลนีมีสีน้ำตาลเหลือง	กาญจนา วรวิทย์วัฒนะ, 2530
D_3	จากการทำคอนจูเกชันระหว่าง *Streptomyces sp.*190-1 กับ *Streptomyces sp.*42-9	คล้าย *Streptomyces sp.*190-1	
21.2Aa		ไม่มีสปอร์โคโลนีมีสีเหลือง	Pinphanichakarn, 1990

ตารางที่ 1(ต่อ) *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆ

สายพันธุ์, รหัสของลูกผสม	แหล่งที่มา	ลักษณะทางกายภาพ	อ้างอิง
19.1 a 19.1 b 19.2 c 19.3 c A C B		ไม่มีสปอร์ โคโลนีมีสีเหลือง ไม่มีสปอร์โคโลนีมีสีชมพู	Pinphanichakarn, 1990
24-13 24-38 24-39 24-43 24-45 24-48 3 4 5 6 8 9 10	จากการหลอมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *Streptomyces sp.*190-1 กับ *Streptomyces sp.*42-9	คล้าย *Streptomyces sp.*42-9	วรางคณา อินทรเสน, 2534

ตารางที่ 1(ต่อ) *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และลูกผสมต่างๆ

สายพันธุ์, รหัสของลูกผสม	แหล่งที่มา	ลักษณะทางกายภาพ	อ้างอิง
11 17 18 19 22 23 24 26 27 35 37 38 40	จากการหลอมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *Streptomyces sp.*190-1 กับ *Streptomyces sp.*42-9	คล้าย *Streptomyces sp.*42-9	วรางคณา อินทรเสน, 2534

4. การเลี้ยงเชื้อ

นำทุกสายพันธุ์ของ *Streptomyces* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง (ภาคผนวกที่ ก1) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7-10 วัน หรือจนได้สปอร์แก่เต็มที่ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ หรือเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มล. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ขูดสปอร์ให้แขวนลอยในน้ำแบ่งสปอร์แขวนลอยที่มีความหนาแน่น 10^7-10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. การตรวจสอบเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและเอนไซม์ไซแลเนส

5.1 ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส โดยนำ 1 มล. ของสปอร์แขวนลอยจากข้อ 4 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวกที่ ก2) ปริมาตร 50 มล. บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ที่มีลวดสปริงขดอยู่ เขย่าตลอดเวลาแบบ reciprocal ด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลานาน 3 วัน จากนั้นนำมาตรึงเอนไซม์ไว้ในเซลโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วกรองเซลผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างเซลด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง นำเซลที่ได้แบ่งไปชั่งหาน้ำหนักเปียก และนำไปอบแห้งแล้วชั่งหาน้ำหนักเซลแห้ง ส่วนเซลที่เหลือนำไปตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ตามวิธีการของ Marshall และKooi(1957) โดยนำเซลที่รู้น้ำหนักเปียกแน่นอนในช่วง 20-30 มก.ใส่ลงในสารละลายผสมของบัฟิกิริยา ประกอบด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 0.6 มล. แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มล. โคบอลท์คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มล. และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มล. ผสมให้เข้ากันกับเซล นำไปบ่มที่ 80 °ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 1.0 มล. เขย่าให้เข้ากัน เก็บสารตัวอย่างที่ 1 นาที และทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที ครั้งละ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 3 มล. (เจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น) แล้วนำมา 0.5 มล. ใส่ลงในกรดซัลฟุริกเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 3 มล. เติมซีสเตอีน-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.1 มล. และตามด้วยอัลกอฮอลลิกคาร์บาโซลเข้มข้น 0.12 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.1 มล. ทันที เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินาน 10 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเย็นจัดเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรักโตสที่ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยที่ 1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโตส 1 ไมโครโมลต่อ 1 นาที

5.2 ตรวจสอบแอคติวิตีเอนไซม์ไซแลเนส โดยนำ 1 มล.ของสปอร์แขวนลอยจากข้อ 4 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวกที่ ก3) ปริมาตร 50 มล. บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ เขย่าตลอดเวลาแบบ rotary ด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ และเก็บตัวอย่างไปตรวจสอบเอนไซม์ไซแลเนสตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Nakajima และคณะ (1984) โดยนำ 2.4 มล.ของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.5 มาผสมกับ 0.3 มล. ของสารละลายไซแลน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินาน 10 นาที และเติมสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม 0.3 มล.ซึ่งบ่มไว้ที่สภาวะเดียวกัน เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 นาทีและที่ 10 นาที ครั้งละ 1 มล.หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

โดยที่ 1 หน่วยของเอนไซม์ไซแลเนสคือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยไซแลนแล้วได้น้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าว

5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์มา 1 มล. เติมอัลคาไลน์-คอปเปอร์รีเอเจนท์(ภาคผนวกที่ ค1.1) 1 มล.ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็นจัดทันทีแล้วเติมเนลสันรีเอเจนท์(ภาคผนวกที่ ค1.2) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 30 นาที เติมน้ำ 5 มล. แล้นำส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การเตรียมสายใยของ *Streptomyces*

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 4 มา 1 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวกที่ ก4) ที่มีปริมาตร 50 มล.ในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีสปริงขดที่ก้นขวด เขย่าแบบ

rotary ด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นนำมาปั่นแยกสายใยด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

7. การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

นำสายใยที่ได้จากข้อ 4 มาล้างด้วยสารละลายซูโครส 10.3 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)แล้วนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Birch และ Cullum (1985) โดยนำสายใยมาเติมสารละลายไลโซไซม์ (ภาคผนวกที่ ข1) โดยมีไลโซไซม์ละลายอยู่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มล. บ่มที่ 37 °ซ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมโปรเนส (10 มก./มล.) ปริมาตร 0.1 มล. เขย่าเบาๆ และบ่มต่อที่ 37°ซ นาน 5 นาที แล้วเติม SDS (10 เปอร์เซนต์) ลงไป 1/10 ของปริมาตรทั้งหมด เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน และบ่มต่อจนกระทั่งสารละลายที่ได้มีลักษณะหนืด จากนั้นนำสารละลายหนืดที่ได้มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ ลงไป 1/10 ของปริมาตรทั้งหมดเขย่าเบาๆให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายฟีนอล (ภาคผนวกที่ ค3) ปริมาตร 6 มล.เขย่าเบาๆให้เข้ากันประมาณ 5 นาที แล้วนำไปปั่นแยกชั้นด้วยความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 20 นาที ดูดแยกสารละลายใสชั้นบนมาเติมสารละลายฟีนอลซ้ำ เขย่าเบาๆ แล้วนำไปปั่นแยกชั้นเช่นเดิม ดูดแยกสารละลายใสชั้นบนมาเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 3 ใน 4 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด เขย่าเบาๆให้เข้ากันจนกระทั่งโครโมโซมอลดีเอ็นเอตกตะกอนลงมา เกี่ยวสายดีเอ็นเอขึ้นมาด้วยปาสเจอร์ปิเปต (pasture pipette) ปลายงอ ล้างสายดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซนต์ ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นนำสายดีเอ็นเอที่ได้ไปละลายในบัฟเฟอร์ TE(ภาคผนวกที่ ข2)ปริมาตร 5 มล.แล้วเติมสารละลายไรโบนิวคลีเอส (40 มก./มล.) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปเขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาเติม SDS (5 เปอร์เซนต์) ปริมาตร 0.5 มล. แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์และสารละลายฟีนอลซ้ำตามวิธีที่กล่าวมาแล้วและดูดชั้นน้ำใสมาเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 3 มล.เขย่าให้กัน แล้วปั่นแยกชั้นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนามาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอลตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

เกี่ยวสายดีเอ็นเอขึ้นมา และล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซนต์ ปล่อยให้แห้ง สุดท้ายนำไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE โดยใช้ปริมาตรที่น้อยที่สุด

8. การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ TE แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งถ้าดีเอ็นเอบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} จะมีค่าเท่ากับ 1.8 กรณีที่อัตราส่วนที่ได้มีค่าต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนอื่นหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่ ต้องนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดซ้ำหรือใช้วิธีอิเลคโตรอีลูชั่น (electroelution) จากอะกาโรสเจล (Hopwood et al., 1985)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 นาโนเมตร โดยค่า OD_{260} เท่ากับ 1 เทียบเท่ากับความเข้มข้นของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Hopwood et al., 1985)

9. การวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ความสมบูรณ์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เทอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TB (ภาคผนวกที่ ข3)ลงในแบบพิมพ์ขนาด 5x5 ซม.ที่มีหวีเสียบอยู่ จนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงดึงหวีออกแล้วหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับสีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวกที่ ค4) ในอัตราส่วน 1:1 ลงในแต่ละหลุมของอะกาโรสเจล หลุมละประมาณ 5 ไมโครลิตร แล้วทำอิเลคโตรโฟรีซิส โดยให้ความต่างศักย์คงที่ที่สัดส่วน 7 โวลต์ต่อความยาวเจลหนึ่งเซนติเมตร เป็นเวลานาน 3 ชม. จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ TB)แช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชม. แล้วล้างออก โดยการแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

10. การตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชันเอนไซม์

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอบริสุทธิ์มาประมาณ 1 ไมโครกรัม เติมเรสตริกชันเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นดังที่จะระบุไว้ในผลการทดลอง และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเรสตริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดที่ใช้ จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นขนาดเล็ก(microcentrifuge) 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1 นาที นำไปบ่มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ เป็นเวลานานอย่างน้อย 8 ชม. แล้วนำมาเติมสีติดตามด้วยอัตราส่วน 1:1(ปริมาตรทั้งหมด : สีติดตาม) และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นขนาดเล็ก 6,000 รอบต่อนาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

11. การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

นำอะกาโรสเจลมา 0.7 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลอมในบัฟเฟอร์ TB และเทลงในแบบพิมพ์ขนาด 9x7 ซม. ที่มีหวีเสียบอยู่ เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหวีที่เสียบอยู่ออกนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 8 มาหยอดลงในหลุมโดยแต่ละหลุมจะมีปริมาณดีเอ็นเอหลุมละประมาณ 400 นาโนกรัม จากนั้นทำอิเลคโตรโฟรีซิสด้วยความต่างศักย์คงที่ตามที่ได้ระบุไว้ในผลการทดลอง จนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนเกือบถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง หยุดกระแสไฟฟ้าแล้วนำเจล ไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ TB) แช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชม. จึงล้างด้วยน้ำกลั่น โดยแช่ทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้น นำเจลที่ย้อมแล้วมาส่องดูการเรืองแสงของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลโดยการถ่ายภาพด้วยฟิลม์ขาวดำไวแสง

12. การวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

นำฟิล์มที่ได้จากการถ่ายภาพขาวดำในข้อ 9 มาวัดตำแหน่งของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยการวัดความเข้มสีของแถบดีเอ็นเอ โดยอาศัยเครื่องวัดค่าความเข้ม (densitometer)และคำนวนหาค่า Disc similarity coefficients (S_D)

เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมต่างๆ ตามวิธีของ Sneath และ Sokal (1973) ดังสูตร

S_D = สองเท่าของจำนวนแถบที่เหมือนกัน/จำนวนแถบทั้งหมด

13. การทำเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส และเอนไซม์ไซแลเนสจาก *Streptomyces sp.*190-1,42-9 และ ลูกผสม ให้บริสุทธิ์

13.1 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์ ตามวิธีของขจีนาฏ จรรยาอุดม (2528) โดยนำ *Streptomyces sp.*190-1 และลูกผสมหมายเลข D_3, 9, 17, 22, 40 มาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส ดังข้อ 5.1 จากนั้นกรองเซลผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำเซลมาสกัดแยกเอนไซม์โดยบดเซล หรือแขวนลอยเซลในสายละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มี 0.1 เปอร์เซนต์ ของ CTAB และ โคบอล์ทคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ โดยให้มีความเข้มข้นไมซีเลียม 1 กรัมต่อสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 มล. เขย่าตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นปั่นแยกไมซีเลียมออกที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้มาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเริ่มจากแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30 เปอร์เซนต์ ปั่นแยกตะกอนออกที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซนต์ ปั่นแยกตะกอนออกที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำตะกอนที่ได้จากลำดับส่วน 30-80 เปอร์เซนต์ มาละลายด้วยบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตรน้อยที่สุดแล้วนำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดิม ภายหลังจากการไดอะไลส์แล้วนำมาวัดปริมาตร ความเข้มข้นโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 แล้วชะโปรตีนที่ไม่เกาะติดคอลัมน์ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และชะโปรตีนที่เกาะติดคอลัมน์ด้วย 0.25 โมลาร์ติดตามโปรตีนที่ถูกชะออกมาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และชะโปรตีนต่อด้วย 0.6 โมลาร์ของสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ใน

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ติดตามโปรตีนที่ถูกชะออกมาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จากนั้นวัดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสในแต่ละลำดับส่วน นำลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีทั้งหมดมาไดอะไลส์ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และทำให้เข้มข้นโดยใช้ตู้อบสูญญากาศ (vacuum oven)ที่อุณหภูมิ 30°ซ จากนั้นวัดปริมาตร แอคติวิตีของเอนไซม์และโปรตีน แล้วนำไปวิเคราะห์โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล

13.2 การทำเอนไซม์ไซแลเนสให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีของกมลวรรณ มั่นภักดี (2534) โดยนำ *Streptomyces sp.*42-9 และลูกผสมหมายเลข D_3,9,17,22,40 มาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส ดังข้อ 5.2 จากนั้นปั่นแยกเซลทิ้ง ที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตโดยเริ่มจากแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20 เปอร์เซนต์ ปั่นแยกตะกอนที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50 เปอร์เซนต์ ปั่นแยกตะกอนแล้วนำตะกอนที่ได้จากลำดับส่วน 20-50 เปอร์เซนต์ มาละลายด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตรน้อยที่สุด แล้วนำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดิม ภายหลังจากการไดอะไลส์แล้วนำมาวัดปริมาตร ความเข้มข้นโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ที่บรรจุดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 แล้วชะโปรตีนที่ไม่เกาะคอลัมน์ด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และชะโปรตีนที่ติดคอลัมน์ด้วย 0.15 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ติดตามโปรตีนที่ถูกชะออกมาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ในแต่ละลำดับส่วนตามลำดับส่วนที่มีเอนไซม์ นำลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งหมดมาไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดิม แล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้ตู้อบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 30°ซ จากนั้นวัดปริมาตร แอคติวิตีของเอนไซม์ และโปรตีนแล้วนำไปวิเคราะห์โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล

14. การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดโปรตีนมา 1 มล. เติมสารละลายผสม C (ภาคผนวกที่ ค2.3) 5 มล. เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำมาเติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนท์ (ภาคผนวกที่ ค2.4) 0.5 มล. เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

15. การทำอิเลคโตรโฟรีซิสบนแผ่นโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล ตามวิธีของ Laemmli (1970)

นำแผ่นกระจกใสขนาด 13.5 x 15.5 ซม. 2 แผ่น ที่ผ่านการล้างให้สะอาดแล้วมาประกบเข้าด้วยกันสอดแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มล. ที่ขอบด้านข้างทั้ง 2 ข้างของแผ่นกระจกใช้เทปกาวพันโดยรอบ 3 ด้าน เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ที่มีความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ ค5.2) ลงไปโดยให้ได้ความสูงประมาณ 9 ซม. พ่นโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ทับลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 0.5-1 ซม. ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว เทโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตทิ้งไป เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (stacking gel) ที่ความเข้มข้นเจล 3.5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ ค5.3) เสียบหวีลงไประหว่างแผ่นกระจกทั้งสอง ปล่อยทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วดึงหวีออกล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวกที่ ค5.4) จนช่องสะอาดเทอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงไปจนท่วมช่องใส่ตัวอย่าง นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาประมาณ 50-100 ไมโครกรัม และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (low molecular weight) มา 10 ไมโครลิตรผสมกับบัฟเฟอร์ที่มีสีติดตาม (ภาคผนวกที่ ค5.5) นำไปต้มในน้ำเดือด 100 °ซ เป็นเวลานาน 2 นาที นำไปปั่นแยกตะกอนทิ้งที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำมาหยอดลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล เริ่มการทำอิเลคโตรโฟรีซิสโดยให้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 35 มิลลิ

แอมแปร์ จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาอยู่ในเซพพาเรติงเจล จึงเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 20 มิลลิแอมแปร์ รอจนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนลงมาประมาณ 2 ซม. จากปลายสุดของแผ่นเจล จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาแช่ในสารละลายสำหรับย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวกที่ ค5.6) เป็นเวลานานกว่า 3 ชม. ล้างสีออกด้วยสารละลายล้างสี (ภาคผนวกที่ ค5.7) จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน นำเจลที่ได้ไปถ่ายรูป

16. <u>การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์</u>

นำเจลจากข้อ 15 มาวัดระยะทางของแถบโปรตีนและแถบของสีติดตาม เพื่อคำนวณหาค่า R_f จากสูตร

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่สีเคลื่อนที่

จากนั้นเทียบกราฟมาตรฐาน ระหว่างการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) กับค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่

ฟอสโฟริเลส บี (phosphorylase b)	น้ำหนักโมเลกุล 94,000
อัลบูมิน (albumin)	น้ำหนักโมเลกุล 67,000
โอวัลบูมิน (ovalbumin)	น้ำหนักโมเลกุล 43,000
คาร์บอนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล 30,000
ทริบซิน อินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor)	น้ำหนักโมเลกุล 20,100