# รายการอ้างอิง


ภาษาไทย

มณีรัตน์ มีพลอย. การเตรียมให้บริสุทธิ์บางส่วนและสมบัติของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542

ภาษาอังกฤษ

Van Aalten, D.M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M.G.,and Eijsink, V.G. 2001. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 8979-8984.

Basha, S. and Ulaganathan, K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards Curvularia lunata. Cur. Sci. 82: 1457-1463.

Bhushan B. 2000. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. J. Appl. Microbiol. 88: 800-808.

Boller, t., and Muach, F. 1988. Colormetric assay for chitinase. In Methods in Enzymology Vol 161, pp. 430-435. New York: Academic Press.

Brameld, K.A., and Goddard, and W.A. 3rd. 1998. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 4276-4281.

Cabib, E. 1988. Assay for chitinase using tritiated chitin. In Methods in Enzymology Vol 161, pp. 424-426. New York: Academic Press.

Frandberg, E., and Schnurer, J. 1994. Evaluation of a chromogenic chito-oligosaccharide analogue, p-nitrophenyl-beta-D-N,N'-diacetylchitobiose, for the measurement of the chitinolytic activity of bacteria. J. Appl. Bacteriol. 76: 259-263.

Frandberg, E., and Schnurer, J. 1994. Chitinolytic properties of *Bacillus pabuli* K1. J. Appl. Bacteriol. 76:361-367.

Frankowski, J.,Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G. and Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Arch. Microbiol. 176:421-426.

Hashimoto, M., Ikegami, T., Seino, S., Ohuchi, N., Fukada, H., Sugiyama, J., Shirakawa, M., and Watanabe, T. 2000. Expression and characterization of the chitin-

binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. J. Bacteriol. 182:3045-3054.

Henrissat, B., and Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 293: 781-788.

Hu, B., Trinh, K., Figueira, W.F., and Price, P.A. 1996. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. J. Biol. Chem. 271: 19415-19420.

Imoto, T., and Yagishita, K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. Agr. Biol. Chem. 35: 1154-1156.

Jeuniaux, C. 1966. Chitinases. In Methods in Enzymology Vol 8, pp. 644-650. New York: Academic Press.

Koga, D.,Mitsutomi, M., Kono, M. and Matsumiya, M. 1999. Biochemistry of chitinases. EXS. 87: 111-123.

Liu, M., Cai, Q.X., Liu, H.Z., Zhang, B.H., Yan, J.P., and Yuan, Z.M. 2002. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. J. Appl. Microbiol. 93: 374-379.

Mabuchi, N., Hashizume, I., and Araki, Y. 2000. Characterization of chitinases excreted by *Bacillus cereus* CH. Can. J. Microbiol. 46: 370-375.

Maeda, H., and Ishida, N. 1967. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. J. Biochem. 62: 276-278.

Molano, J., Polacheck, I., Duran, A., and Cabib, E. 1979. An endochitinase from wheat germ. J. Biol. Chem. 254: 4901-4907.

Ohtakara, A. 1988. Viscosimetric assay for chitinase. In Methods in Enzymology. Vol. 161(49), pp. 426-430. New York: Academic Press.

O'Brien, M., and Colwell, R.R. 1987. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumberiferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1718-1720.

Pleban, S., Chernin. L., and Chet, I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. Lett. Appl. Microbiol. 25: 284-288.

Pinto, A.de S., Barreto, C.C. Schrank, A., Ulhoa, C.J. and Vainstein, M.H. 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entopathogen *Methrhizium anisopliae*. Can. J. Microbiol. 43: 322-327.

Ramos, H.C., Hoffmann, T., Marino, M., Marino, M., Nedjari, Presecan-Siedel, P., Dreesen, O., and glaser, P. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtitis*: Physiology and regulation of gene expression. J. Bacterio. 182 : 3072-3080.

Ravi Kumar,M.N.V. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Polymer. 46: 1-27

Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I,, Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J., and Zilberstein, A. 1996. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against Spodoptera littoralis larvae. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3581-3586.

Roberts, R.L.,and Cabib, E. 1982. *Serratia marcescens* chitinase: one-step purification and use for the determination of chitin. Anal. Biochem. 127: 402-412

Roberts, W.K., and Selitrennikoff, C.P. 1988. Plants and bacterial chitinase differ in antifungal activity. J. Gen. Microbiol. 134: 169-176.

Sakai, K., Narihara, M., Kasama, Y., Wakayama, M., and Moriguchi, M. 1994. Purification and characterization of thermostable beta-N-acetylhexosaminidase of *Bacillus stearothermophilus* CH-4 isolated from chitin-containing compost. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2911-2915.

Sakai, K, Yokota, A, Kurokawa, H, Wakayama, M, and Moriguchi M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3397-3402.

Sakurada, M., Morgavi, D.P., Komatani, K., Tomita, Y., and Onodera, R. 1997. Purification and characteristics of an autolytic chitinase of *Piromyces communis* OTS1 from culture medium. Curr. Microbiol. 35: 48-51.

Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto, M., Watanabe, T., and Fukamizo, T. 2002. Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes. J. Biochem. (Tokyo) 131: 557-564.

Schales, O., and Schales, S.S. 1945. A simple method for the determination of glucose in blood. Arc. Biochem. 8: 285-292.

Takayanagi, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y., and Shimahara, K 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. Biochim. Biophys. Acta. 1078: 404-410.

Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S., Tantimavanich, S., and Panbangred W. 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. pakistani. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 395-401.

Trachuk, L.A.,Revina, L.P., Shemyakina, T.M., Chestukhina, G.G. and Stepanov, V.M. 1996. Chitinases of *Bacillus licheniformis* B-6839 isolation and properties. Can. J. Microbiol. 42:307-315.

Tronsmo, A., and Harman, G.E. 1993. Detection and quantification of N-acetyl-β-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solution on gel. Anal. Biochem. 208: 74-79.

Trudel, J., and Asselin, A. 1988. Dectection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 178: 362-366.

Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J, and Watanabe T. 2001. Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. J. Biol. Chem. 276: 41343-41349.

Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., and Miyashita, K. 1999. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. Microbiology. 145:3353-3363.

Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., and Tanaka, H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. J. Bacteriol. 172: 4017-4022.

Wang, S.L., and Chang, W.T. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. Appl. Environ. Microbiol. 63:380-386

Wang, S.L., Shih, I.L., Liang, T.W., and Wang, C.H. 2002. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. J. Agric. Food Chem. 50: 2241-2248.

Wen, C., Tseng, C., Cheng, C., and Li, Y. 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. Biotechnol. Appl. Biochem. 35: 213-219.

Wedrychowski, A.R., Olinski, and Hnilica, L.S. 1986. Modified method of silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 159: 323-328.

Wiwat, C., Siwayaprahm, P., and Bhumiratana, A. 1999. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. Curr. Microbiol. 39: 134-140.

Xia, G., Jin, C., Zhou, J., Yang, S., Zhang, S., and Jin C. 2001 A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. Eur. J. Biochem. 268: 4079-4085.

# ภาคผนวก

**ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมคอลลอยดัลไคทิน** (Colloidal chitin)

ทำตามวิธีของมณีรัตน์ มีพลอย (2542) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Shimahara และ Takiguchi (1988)

นำไคทินจากเปลือกปูที่ผ่านการคัดขนาดที่ 42-mesh จำนวน 5 กรัม ค่อย ๆ เติมลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส พร้อมกับกวนอย่างแรงด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก เมื่อผสมไคทินเป็นเนื้อเดียวกันแล้วค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิของสารผสมเป็น 37-40 องศาเซลเซียส พร้อมกับปรับเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กให้มีความเร็วปานกลาง จะสังเกตเห็นว่าความหนืดของสารผสมจะเพิ่มขึ้น จากนั้นประมาณ 2-3 นาที ความหนืดจะเริ่มลดลงและใสขึ้น ทำการกรองสารผสมที่ได้ด้วยใยแก้ว (glass wool) เพื่อกำจัดเศษไคทินที่ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ออกไป ผ่านส่วนที่กรองได้ลงในน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว (deionized water) ปริมาตร 4 ลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียสพร้อมกับกวนด้วยความเร็วปานกลาง ภายในเวลาประมาณ 10-15 นาที สารจะขุ่นขึ้นเนื่องจากไคทินเกิดการตกตะกอนอีกครั้ง หยุดกวน หลังจาก 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนใสข้างบนทิ้งไป ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว โดยนำไปปั่นล้างที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่ง pH ใกล้เคียงกับน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว จากนั้นนำตะกอนทั้งหมดมากระจาย (resuspend) ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยการกวนด้วยความเร็วปานกลางอีกครั้ง เมื่อตะกอนกระจายทั่วแล้วดูดคอลลอยดัลไคทินออกมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน eppendrof เพื่อหานำไปหาน้ำหนักแห้งโดยนำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งแล้วนำไปคำนวณเปอร์เซ็นคอลลอยดัลไคทินที่ได้ (ผลผลิตที่ได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์) เก็บคอลลอยดัลไคทินที่เหลือในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารละลาย**

1. **สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลาย**

**1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0**

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) 1.46 กรัม และกรดซิตริกโมโนไฮเดรท ($C_6H_8O_7.H_2O$) 1.02 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**1.2 สารละลายเอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีนมาตรฐาน**

ละลายเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร

**1.3 สารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์**

ละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$ ) 0.5 กรัม ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

2. **สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน**

**2.1 Bradford stock solution**

ละลาย Coomassie Brilliant Blue G 350 มิลลิกรัม ในกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กข้ามคืนเพื่อให้ Coomassie Brilliant Blue G ละลายหมด หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**2.2 Bradford working solution**

ผสม Bradford stock solution ปริมาตร 30 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในขวดสีชา ห่อด้วยฟอยด์อีกชั้นหนึ่ง เก็บได้นานหลายสัปดาห์ในที่เย็น

**2.3 สารละลาย BSA มาตรฐาน**

ละลาย BSA 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

3. **สารละลายสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยดีอีเออีคอลัมน์**

**3.1 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 400 มิลลิโมลาร์ pH 7.4**

ละลาย ทริส 24.228 กรัม ในน้ำปริมาตร 470 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้เป็น 7.4 หลังจากนั้นเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

**3.2 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4**

นำสารละลายในข้อ 3.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเติมน้ำให้เป็น 4 ลิตร

**3.3 โซเดียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4**

ละลาย NaCl 11.688 g ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 จากข้อ 3.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**3.4 โซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4**

นำสารละลายในข้อ 3.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายในข้อ 3.2 ให้มีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

**3.5 โซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4**

นำสารละลายในข้อ 3.3 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายในข้อ 3.2 ให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

**3.6 โซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4**

นำสารละลายในข้อ 3.3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายในข้อ 3.2 ให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

**4.สารละลายสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยรีเจนเนอเรทเทดไคทิน**

**4.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 โมลาร์ pH 7.4**

ชั่ง $Na_2HPO_4.2H_2O$ 2.28 กรัม และ $NaH_2PO_4.H_2O$ 0.58 กรัม มาเติมน้ำกลั่น 970 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 7.4 แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

**4.2 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5**

ชั่ง $CH_3COONa.3H_2O$ 2.72 กรัม เติมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาปรับ pH ให้เป็น 5.5 ด้วยกรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

**4.3 กรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์**

นำกรดอะซิติกเข้มข้นมา 1.14 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

**5. สารละลายสำหรับทำคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200**

**5.1 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4**

ทำเหมือนข้อ 3.2

**6. สารละลายสำหรับการทำดิสค์-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส**

**6.1 สารละลายทริส-ไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์** pH 8.3

ชั่ง Tris 3 กรัม และ glycine 14.14 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 950 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 8.3 นำมาเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร

**6.2 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์** pH 8.8

ชั่ง Tris 18.2 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้เป็น 8.8 หลังจากนั้นนำมาเติมน้ำให้เป็น 100 มิลลิลิตร

**6.3 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์** pH 6.8

ชั่ง Tris 6 กรัม เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้เป็น 6.8 หลังจากนั้นนำมาเติมน้ำให้เป็น 100 มิลลิลิตร

**6.4 สารละลายอะคริลาไมด์**

ชั่งอะคริลาไมด์ 30 กรัม และบิส-อะคริลาไมด์ 0.8 กรัม มาเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง แล้วเก็บในขวดสีชา นำไปห่อด้วยฟอยด์อีกชั้นหนึ่ง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**6.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต**

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตมา 0.1 กรัม นำละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ห่อด้วยฟอยด์ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

**6.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง**

ชั่งโบรโมฟีนอลบลู 10 มิลลิกรัม และซูโครส 15 กรัม เติมลงในสารละลายข้อ 6.3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6.7 50% methanol/ 10 % acetic acid

ผสม absolute methanol 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน

**6.8 น้ำยาย้อมสีโปรตีน**

ชั่ง silver nitrate 0.4 กรัมมาเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเติมลงในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.36 เปอร์เซ็นต์ NaOH ปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมกับแอมโมเนีย 0.84 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ หยดลงไปและเขย่าเบา ๆ จนสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นใส เติมน้ำเป็น 50 มิลลิลิตร ให้ใช้หลังจากเตรียมเสร็จภายใน 15 นาที

6.9 developing solution

ผสมกรดซิตริก 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับ 38 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเข้าด้วยกัน เติมน้ำให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ใช้ต้องเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แล้วใช้ทันที

6.10 1 % acetic acid

นำกรดอะซิติกเข้มข้น 1 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร

**7. สารละลายสำหรับทำเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส**

**7.1 สารละลายทริส-เอสดีเอสอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์** pH 8.3

เตรียมเหมือนข้อ 6.1 แต่ให้เติม SDS 1 กรัมเพิ่มลงไปในสารละลาย

**7.2 สารละลายทริส-เอสดีเอสบัฟเฟอร์** pH 8.8

เตรียมเหมือนข้อ 6.2 แต่ให้เติม SDS 0.4 กรัมเพิ่มลงไปในสารละลาย

**7.3 สารละลายทริส-เอสดีเอสบัฟเฟอร์** pH 6.8

เตรียมเหมือนข้อ 6.3 แต่ให้เติม SDS 0.4 กรัมเพิ่มลงไปในสารละลาย

**7.4 สารละลายอะคริลาไมด์**

เตรียมเหมือนข้อ 6.4

**7.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต**

เตรียมเหมือนข้อ 6.5

**7.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง**

ชั่งโบรโมฟีนอลบลู 10 มิลลิกรัม ซูโครส 15 กรัม SDS 2.5 กรัมและ 2-mercaptoethanol 2 มิลลิลิตร ละลายในสารละลายข้อ 7.3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

7.7 50% methanol/10 % acetic acid

ผสม absolute methanol 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน

**7.8 น้ำยาย้อมสีโปรตีน**

ชั่ง silver nitrate 0.4 กรัมมาเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเติมลงในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.36 เปอร์เซ็นต์ NaOH ปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมกับแอมโมเนีย 0.84 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ หยดลงไปและเขย่าเบา ๆ จนสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นใส เติมน้ำเป็น 50 มิลลิลิตร ให้ใช้หลังจากเตรียมเสร็จภายใน 15 นาที

7.9 developing solution

ผสมกรดซิตริก 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับ 38 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเข้าด้วยกัน เติมน้ำให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ใช้ต้องเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แล้วใช้ทันที

**8. สารละลายสำหรับติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นพอลีอะคริลาไมด์เจล**

**8.1 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์** pH 5.0

ชั่ง $CH_3COONa.3H_2O$ 0.953 กรัมมาละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH เป็น 5.0 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

8.2 **สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์** pH 8.9

ชั่ง Tris 30.29 กรัมนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 8.9 นำไปเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร

8.3 **สารละลายฟลูออเรสเซนซ์ 0.01 เปอร์เซ็นต์** (Fluorescence brightener 28 solution)

ชั่ง Fluorescence brightener 28 5 มิลลิกรัม เติมสารละลายในข้อ 8.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

9. **สารละลายสำหรับติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจล**

9.1 **สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์** pH 5.0

ทำเหมือนข้อ 8.1

9.2 **สารละลาย** Triton X-100 1.0 **เปอร์เซ็นต์**

นำ Triton X-100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายในข้อ 9.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

9.3 **สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์** 0.5 **โมลาร์** pH 8.9

ทำเหมือนข้อ 8.3

9.4 **สารละลายฟลูออเรสเซนซ์ 0.01 เปอร์เซ็นต์**

ทำเหมือนข้อ 8.4

10. **สารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการ** optimum pH

10.1 **สารละลายบัฟเฟอร์** McIlvaine 0.1 **โมลาร์** pH 3.0

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 0.58 กรัม และ $C_6H_8O_7.H_2O$ 1.67 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 3.0 แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

10.2 **สารละลายบัฟเฟอร์** McIlvaine 0.1 **โมลาร์** pH 4.0

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 1.09 กรัม และ $C_6H_8O_7.H_2O$ 1.29 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 4.0 แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

10.3 **สารละลายบัฟเฟอร์** McIlvaine 0.1 **โมลาร์** pH 5.0

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 1.46 กรัม และ $C_6H_8O_7.H_2O$ 1.02 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 5.0 แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

**10.4 สารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0**

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 0.19 กรัม และ $NaH_2PO_4$ 1.36 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 6.0 แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

**10.5 สารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0**

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 0.85 กรัม และ $NaH_2PO_4$ 0.62 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

**10.6 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.0 และ pH 9.0**

ชั่ง Tris 1.21 กรัม มาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกให้เป็น 8.0 และ 9.0 หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

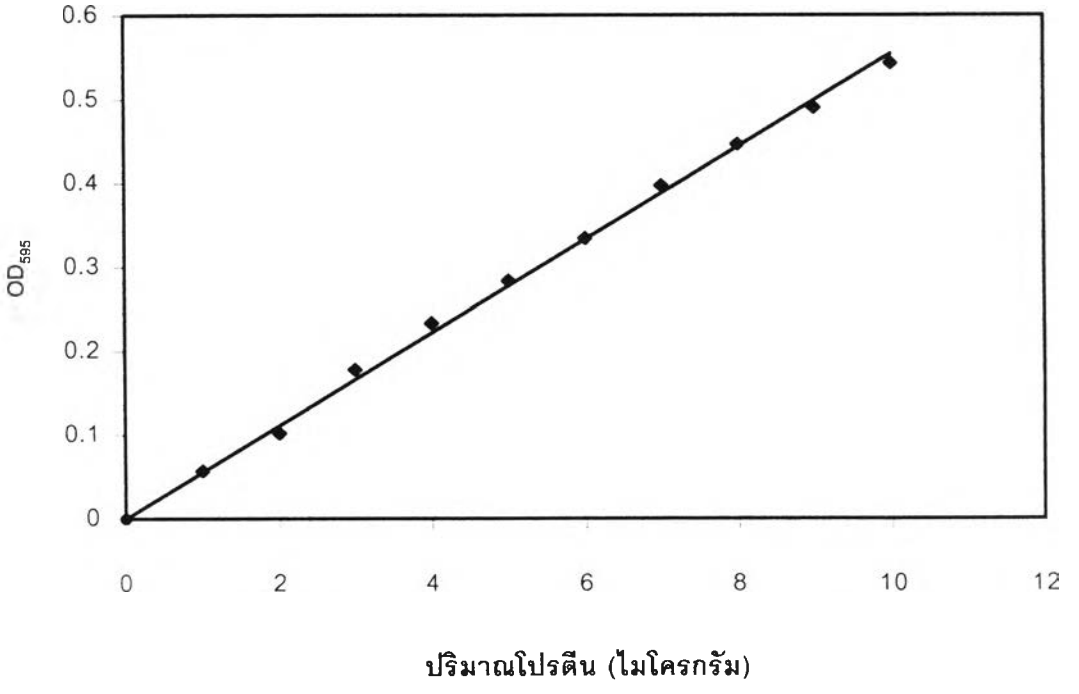
**10.7 สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.0**

ชั่งไกลซีน 0.19 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับ pH ด้วย NaOH ให้เป็น 10.0 นำมาเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

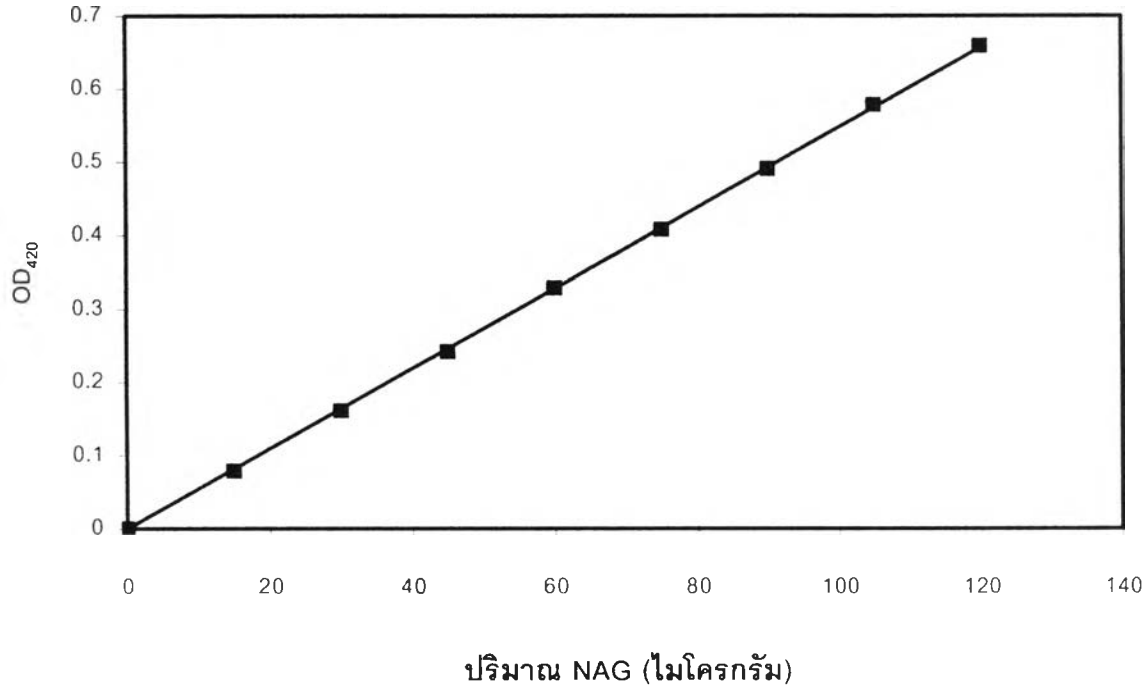
**10.8 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 11.0 และ pH 12.0**

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 0.36 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 11.0 และ 12.0 ด้วย NaOH หลังจากนั้นนำมาเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

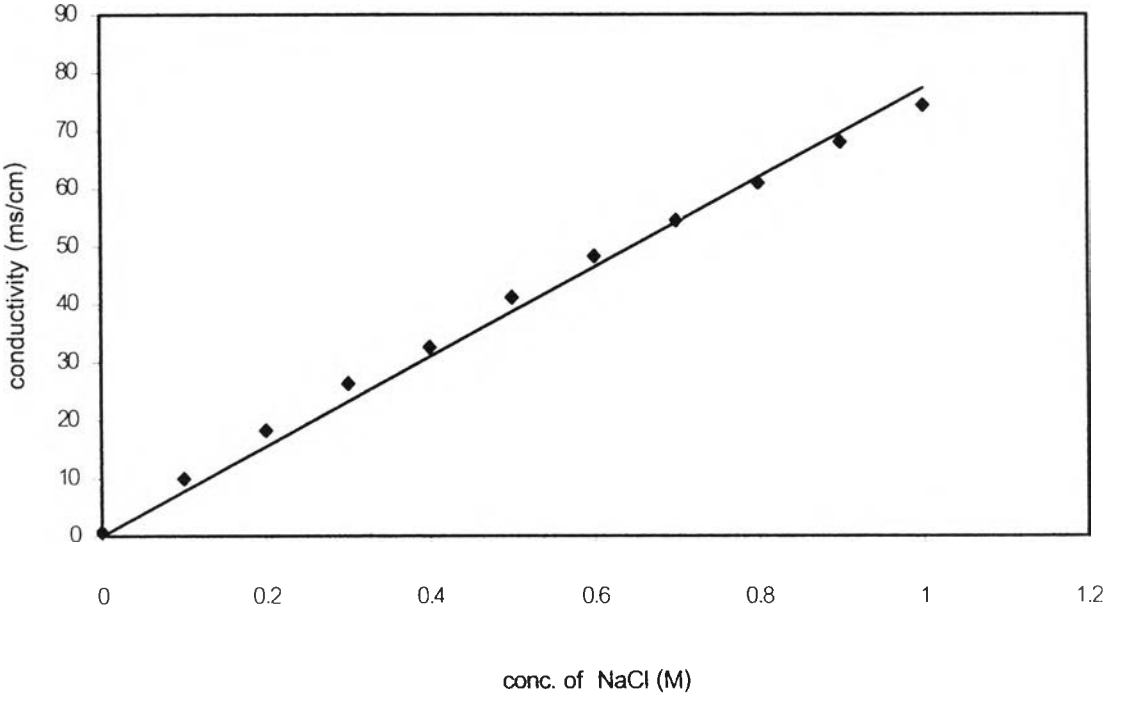
**ภาคผนวกที่** 3 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford (1976) ใช้ความเข้มข้นของ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐานในช่วง 0-10 ไมโครกรัม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร



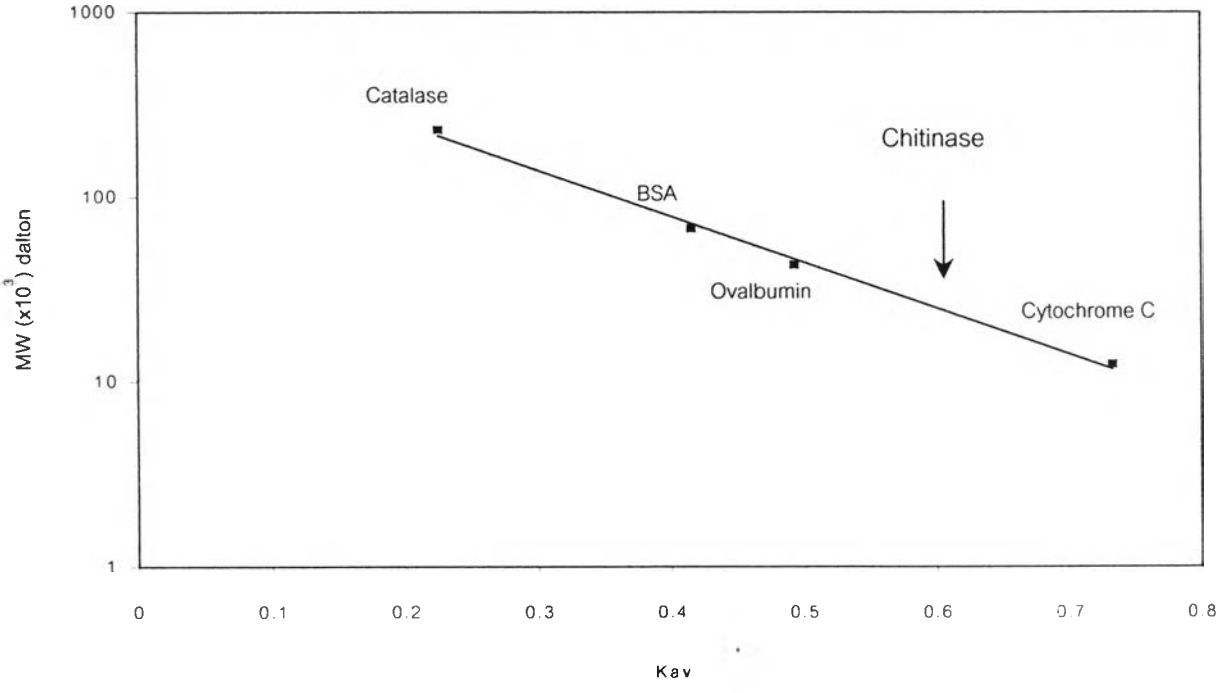
**ภาคผนวกที่ 4** กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณ NAG โดยวิธีของ Imoto และ Yagishita (1971) โดยใช้ความเข้มข้น NAG 0-120 ไมโครกรัมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร



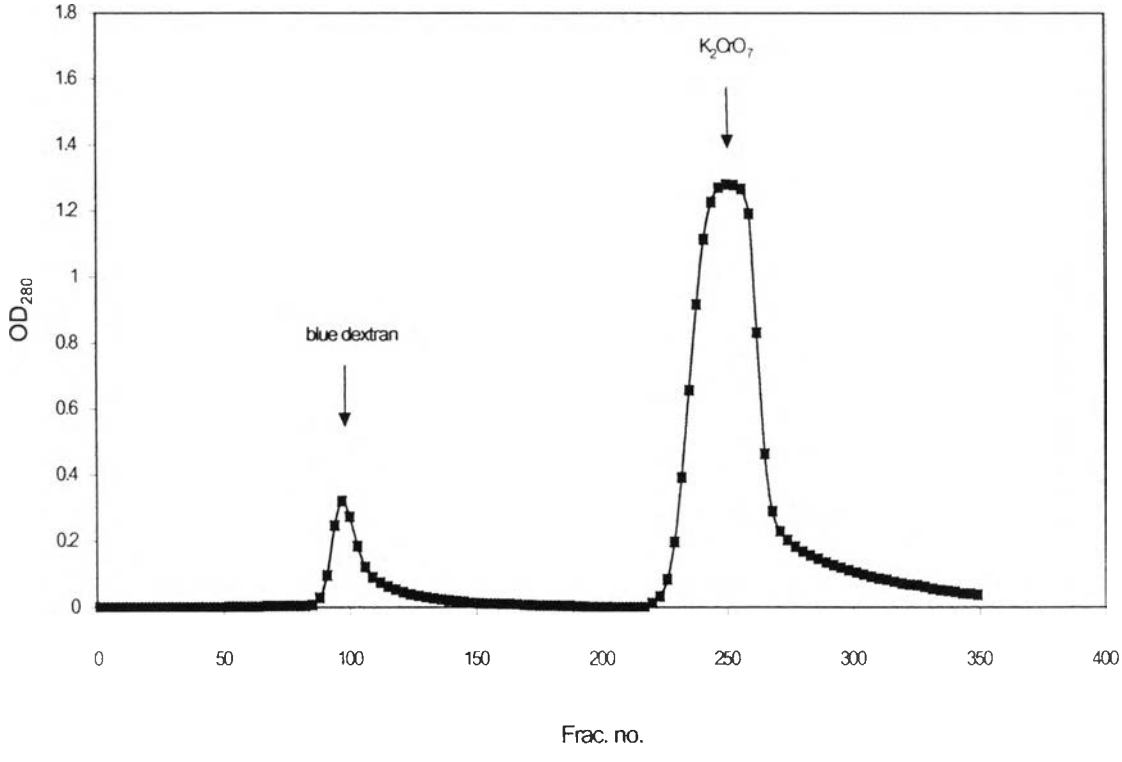
**ภาคผนวกที่** 5 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0-1 โมลาร์ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 โดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity)



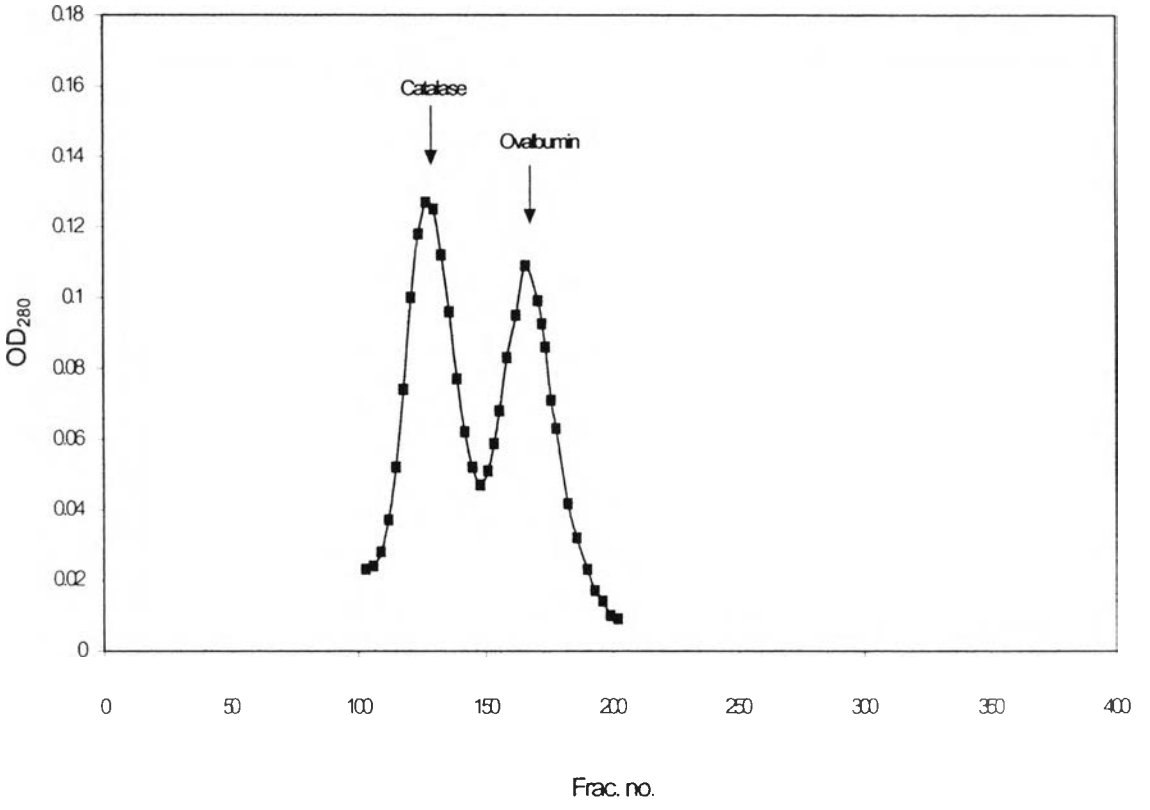
**ภาคผนวกที่** 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง $K_{av}$ และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไคทิเนสโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 (ขนาด 2.0x90 เซนติเมตร) ตามวิธีในข้อ 3.7.1 โปรตีนที่ใช้เป็น marker ได้แก่ ไซโตโครม ซี (cytochrome C) โอวัลบูมิน (Ovalbumin) โบไวซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) และคาตาเลส (Catalase) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 12.5, 43, 68 และ 232 กิโลดาลตัน ตามลำดับ



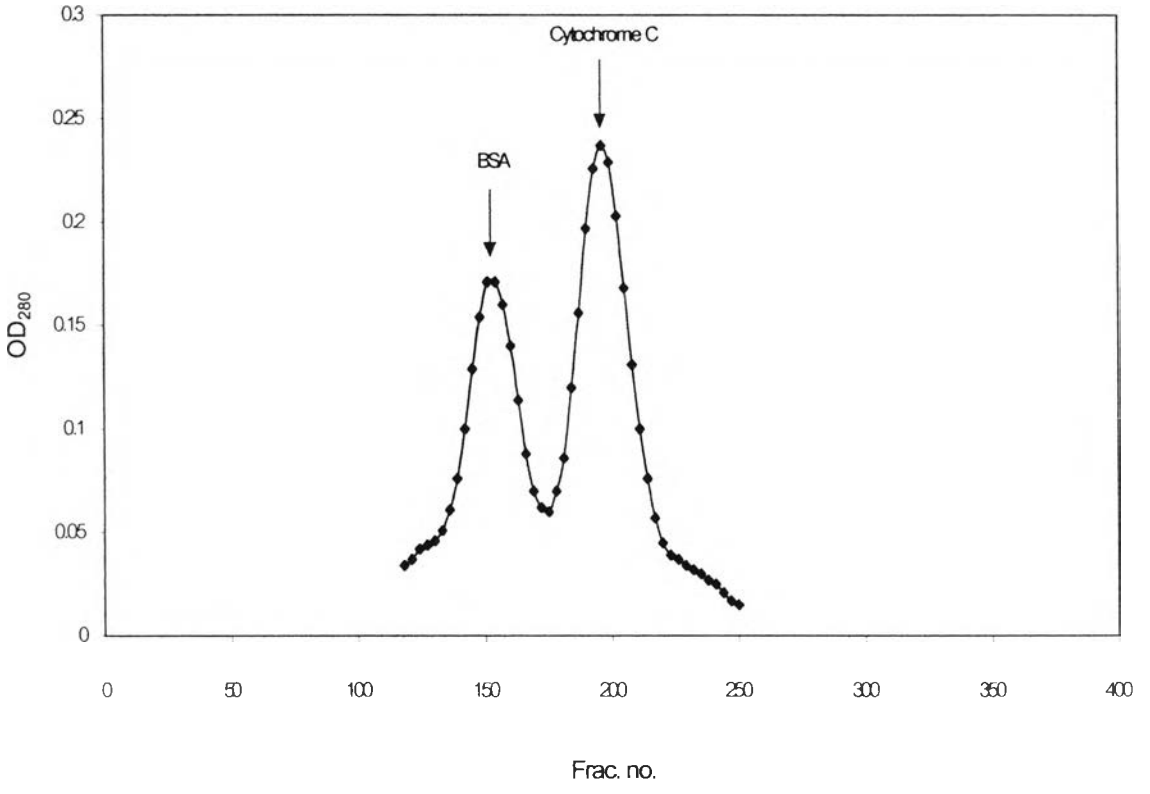
**ภาคผนวกที่** 7 กราฟแสดงการหา void volume และ total volume ของคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 (ขนาด 2.0x90 เซนติเมตร) ตามวิธีในข้อ 3.7.1



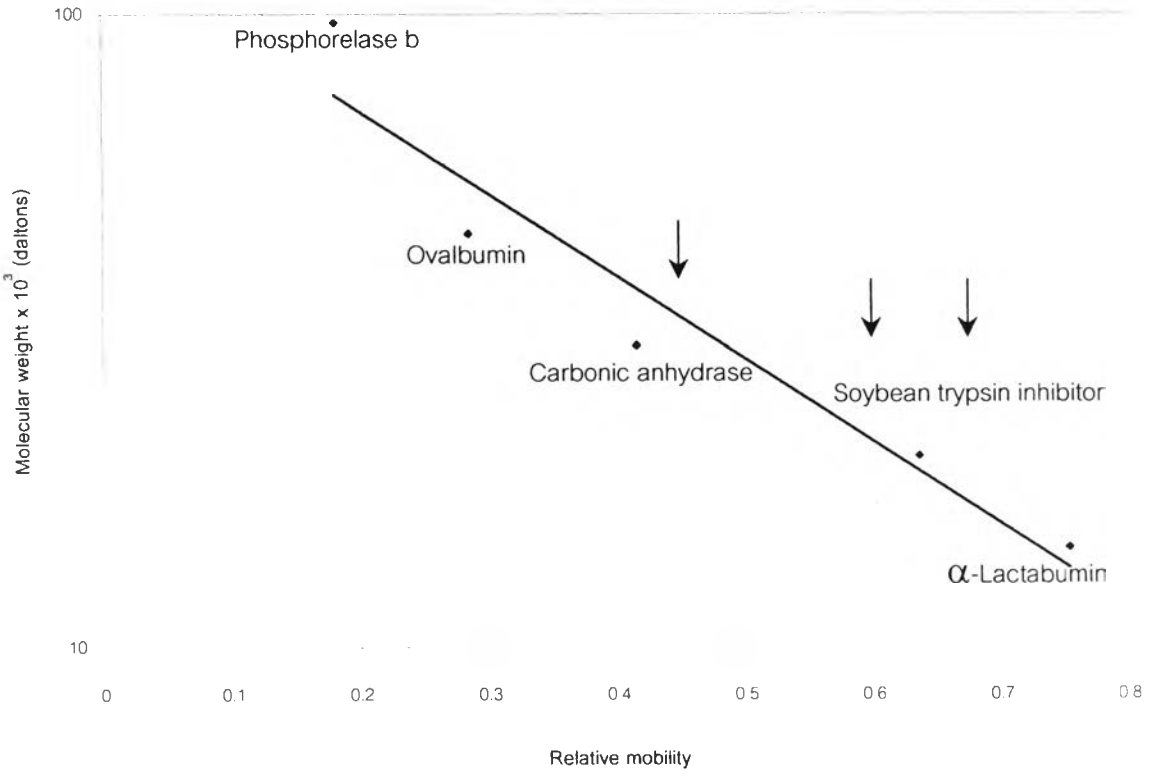
**ภาคผนวกที่** 8 กราฟแสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไคทิเนสโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 (ขนาด 2.0x90 เซนติเมตร) ตามวิธีในข้อ 3.7.1 โปรตีนที่ใช้เป็น marker ได้แก่ โอวัลบูมิน (Ovalbumin) และคาตาเลส (Catalase) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 43 และ 232 กิโลดาลตัน ตามลำดับ



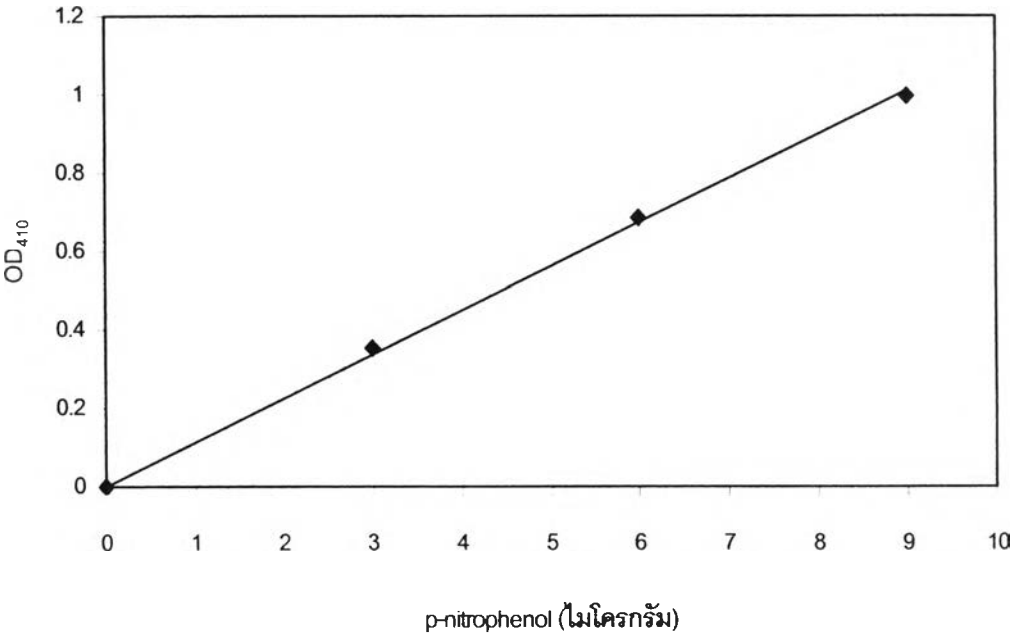
**ภาคผนวกที่** 9 กราฟแสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไคทิเนสโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 (ขนาด 2.0x90 เซนติเมตร) ตามวิธีในข้อ 3.7.1 โปรตีนที่ใช้เป็น marker ได้แก่ ไซโตโครม ซี (cytochrome C) และ โบไวซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 12.5 และ 68 กิโลดาลตัน ตามลำดับ



**ภาคผนวกที่** 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไคทิเนสโดยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส ตามวิธีทำในข้อ 3.6 โปรตีนมาตราฐานที่ใช้ได้แก่ สารละลายผสมของแอลฟา-แลคตาบูมิน (α-Lactabumin) ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) โอวัลบูมิน (Ovalbumin) และฟอสฟอริลเลส บี (Phosphorylase b) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14.4, 20.1, 30, 45 และ 97 กิโลดาลตัน ตามลำดับ



**ภาคผนวกที่ 11** กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณ p-nitrophenol ตามวิธีของ Roberts และ Selitrennikoff (1988) ใช้ความเข้มข้นของ p-nitrophenol ปริมาณไมโครกรัม วัดการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ชมพูนุท รักอำนวยกิจ เกิดวันที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2520 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาชีววิทยา) จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2542 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิตที่ภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2542