ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ประกอบด้วย

Proteose peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 6.5 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient Agar (NA) ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น (ยกเว้น agar) ปรับให้มีพีเอช 7.0 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl จึงใส่วุ้นลงไป หลอมละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Trypticase Soy Broth (TSB) ประกอบด้วย

Tryptone	5	กรัม
Soytone	5	กรัม
Sodium chlorine	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับให้มีพีเอช 7.3 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry's method

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A : 1% (w/v) $CuSO_4.5H_2O$ ในน้ำกลั่น
2. สารละลาย B : 1% (w/v) Sodium Potassium tartarate.$4H_2O$
3. สารละลาย C : 2 % (w/v) Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH
4. สารละลาย D : ผสม A และ B ในอัตราส่วน 1 : 1 (w/v) ส่วน แล้วเติมสาร C 98 ส่วน
5. เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ด้วยน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 (w/v)

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที
2. ใส่สารละลาย Folin เจือจาง 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้นาน 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นที่เตรียมเหมือนตัวอย่างเป็น Blank
4. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน
5. นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) ดังแสดงในภาพประกอบที่

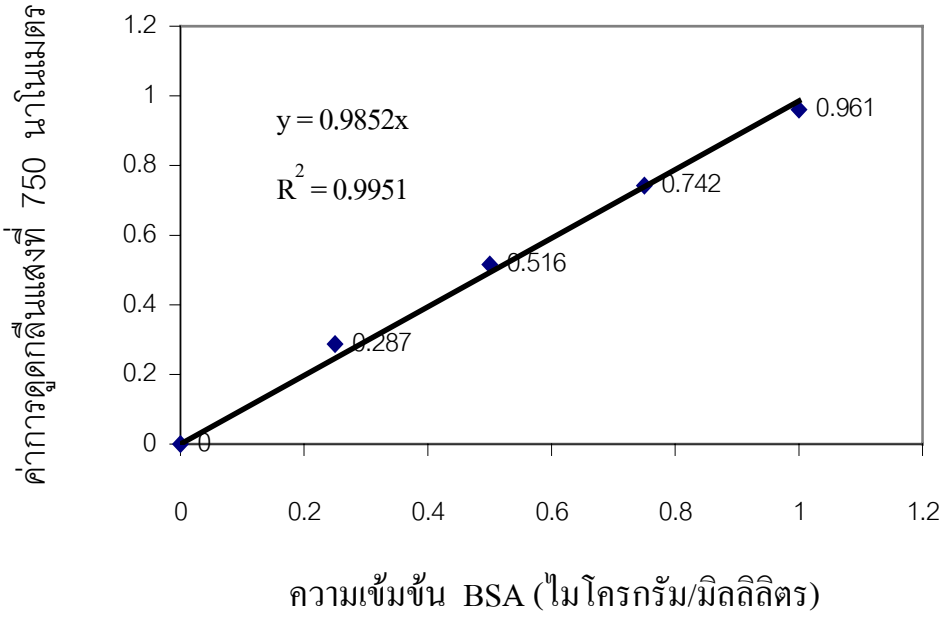
การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

1. ละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้เป็น Stock solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. เจือจางสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมินให้ได้ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำ Stock solution ปริมาตร 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. หาปริมาณโปรตีนของแต่ละความเข้มข้นตามวิธีการข้างต้น

4. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนโบวินซีรัมอัลบูมินกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานโปรตีน

Figure 14 Protein standard curve

2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM พีเอช 6.5

สารเคมี

สารละลาย A : สารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 mM ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 6.899 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 50 mM ($Na_2HPO_4.2H_2O$ 8.902 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

วิธีการเตรียม

โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 6.5 โดยการวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

3. การเตรียมสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 M พีเอช 3.0

สารเคมี

สารละลาย A : สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 M (กรดอะซิติก 11.51 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : ละลาย $C_2H_3O_2Na$ 16.4 กรัม (ความเข้มข้น 0.2 M) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

วิธีการเตรียม

โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 3.0 โดยการวัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล โดยวิธี Lane และ Eynon (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 2000)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายเฟลิง A : ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟตจำนวน 69.28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

2. สารละลายเฟลิง B : ชั่งโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรตเตตราไฮเดรต จำนวน 346 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 กรัมแล้วละลายในน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

3. สารละลายเดกซ์โทรส : ชั่งเดกซ์โทรสบริสุทธิ์ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 3.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

4. เมทิลีนบลู ความเข้มข้นร้อยละ 1 : ชั่งเมทิลีนบลู 1.0 กรัมละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายนิวทรัลเลดอะซิเตตความเข้มข้นร้อยละ 10 : ชั่งนิวทรัลเลดอะซิเตต 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

6. สารละลายโปแตสเซียมออกซาเลตความเข้มข้นร้อยละ 10 : ชั่งโปแตสเซียมออกซาเลต จำนวนหนัก 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

7. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

8. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

<u>การหาค่ามาตรฐาน ของสารละลายเฟลิง</u>

ก. การไตเตรตหาค่ามาตรฐานเบื้องต้น (Preliminary determination)

1. ปิเปตสารละลายเฟลิงเอและบี อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่รวมกันในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายเดกซ์โทรสจากบิวเรตลงไปประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. ต้มให้เดือดอย่างรวดเร็ว เมื่อเดือดนานประมาณ 15 วินาที เติมสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 2-3 หยด ซึ่งจะสามารถสังเกตการเกิดสีน้ำเงินชัดเจน (ถ้าไม่เกิดสีน้ำเงินแสดงว่าใช้เดกซ์โทรสหรือตัวอย่างน้ำตาลมากเกินไป ให้ทำใหม่โดยลดปริมาณของเดกซ์โทรสหรือตัวอย่างน้ำตาลลงจากเดิม)

4. ไตเตรตจนสีน้ำเงินของเมทิลีนบลูเปลี่ยนไปเป็นสีแดงอิฐ (ณ จุดยุติ) ในระหว่างการไตเตรตนี้จะต้องไตเตรทขณะสารละลายในขวดรูปชมพู่เดือดอยู่ตลอดเวลา

5. บันทึกปริมาตรของสารละลายเดกซ์โทรสที่ใช้ในการไตเตรตตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงจุดยุติ

ข. การไตเตรตหาค่ามาตรฐานที่แน่นอน (Accurate determination)

1. ทำเช่นเดียวกับวิธีกับการไตเตรตเบื้องต้น แต่เติมสารละลายเดกซ์โทรสลงไปในขวดรูปชมพู่จนเกือบจะถึงจุดยุติ (ให้น้อยกว่าจุดยุติของการหาค่ามาตรฐานเบื้องต้นประมาณ 1 มิลลิลิตร)

2. ตั้งไฟต้มให้เดือดโดยเร็วจากนั้นปล่อยให้เดือดอย่างสม่ำเสมอนาน 2 นาที

3. เติมสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 2–5 หยด

4. ไตเตรตโดยเติมสารละลายเดกซ์โทรสครั้งละ 2–3 หยด จนกระทั่งถึงจุดยุติการ ไตเตรตนี้ต้องให้เสร็จภายใน 1 นาที หลังจากเติมเมทิลีนบลูและต้องให้สารละลายในขวดรูปชมพู่เดือดตลอดเวลาพร้อมทั้งเขย่าให้เข้ากันเสมอ

5. บันทึกปริมาตรของสารละลายเดกซ์โทรสที่ใช้ในการไตเตรตและคำนวณค่าเฟคเตอร์ของสารละลายเฟลิงได้ดังนี้

แฟคเตอร์ (F) = ปริมาตรของตัวไตเตอร์ (มล.) x น้ำหนักเดกซ์โทรส (กรัม)ใน 10 มล.

<u>การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลอินเวิร์ทในน้ำตาลโตนด</u>

1. ชั่งน้ำหนักน้ำตาลโตนดให้ได้ค่าที่แน่นอน (ประมาณ 120 กรัม) แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย

2. เติมสารละลายนิวทรัลเลดอะซิเตตเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร

3. เขย่าให้เข้ากันแล้วกรอง ดูดส่วนที่กรองได้ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลายโปแตสเซียมออกซาเลตความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 250 มิลลิลิตร

5. เขย่าให้เข้ากันแล้วกรองแบ่งส่วนที่กรองได้ ออกเป็นสองส่วน โดยส่วนที่หนึ่งประมาณ 150 มิลลิลิตร เก็บไว้สำหรับไตเตรตตามวิธีในข้อ ก. ส่วนที่สองใช้สำหรับหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ดังนี้

5.1 ปิเปตส่วนที่กรองได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

5.2 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร

5.3 นำสารละลายนี้ไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

5.4 ทำให้เย็นลงและทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร

5.5 นำสารละลายจากข้อ 5.4 มาไตเตรตกับสารละลายเฟลิง ตามวิธีในข้อ ก. (ปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการไตเตรตนี้ ต้องอยู่ในช่วง 15–50 มิลลิลิตร จึงจะใช้ได้ ถ้าต่ำหรือสูงกว่านี้ต้องเพิ่มน้ำหนักน้ำตาลสดที่ใช้หรือต้องเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ใช้ไตเตรตนั้นใหม่ให้ได้ความเข้มข้นพอเหมาะ)

การคำนวณ

$$\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละ)} = \frac{F \times 100 \times 250 \times 250}{w \times 100 \times v}$$

น้ำตาลทั้งหมด (ร้อยละ) $= \dfrac{F \times 100 \times 250 \times 250 \times 250}{w \times 100 \times 20 \times v}$

เมื่อ F = แฟคเตอร์ของสารละลายเฟลิง

w = น้ำหนักน้ำตาลโตนด (กรัม)

v = ปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ในการไตเตรต (มิลลิลิตร)

5. การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ (A.O.A.C., 2000)

ใช้สารละลายมาตรฐาน silver nitrate ที่มากเกินพอ ตกตะกอน chloride ion ในตัวอย่างในตัวกลางที่เป็นกรดของ nitric acid เคลือบตะกอนที่เกิดขึ้นนี้ไว้ด้วย nitrobenzene แล้ว titrate หาปริมาณ silver nitrate ที่เหลือจากปฏิกิริยาด้วยสารละลาย ammonium thiocyanate โดยมี ferric ammonium sulfate TS เป็น indicator ตัดสินจุดยุติโดยการดูการเกิดสีแดงของ ferric thiocyanate

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 0.1 N ammonium thiocyanate
2. Conc. Nitric acid
3. Ferric ammoniumsulfate TS
4. Silver nitrate

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1 N Silver nitrate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในการเตรียม Blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2 เติม Nitric acid เข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ Ferric ammonium sulfate TS ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงไป

3. ไตเตรดด้วยสารละลาย 0.1 N ammonium thiocyanate จนสารละลายเริ่มมีสีน้ำตาลแดง

4. ทำการเขย่า ถ้าสียังคงตัวแสดงว่าถึงจุดยุติ

6. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซีสดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

เตรียมสารละลายเป็น stock solution ดังนี้

1. Acrylamide-bis (30 เปอร์เซ็นต์ T, 2.67 เปอร์เซ็นต์ C)

Acrylamide 29.2 กรัม และ N'N-bis-methylene-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากการเตรียม

2. Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8

ละลาย Tris-base 18.17 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้เป็น 8.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8

ละลาย Tris-base 6.06 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้เป็น 6.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10

ละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต 10 กรัมในน้ำกลั่นแล้วกวนเบาๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5. Stock sample buffer

เตรียมโดยผสมสารต่างๆ ในอัตราส่วนดังนี้

น้ำกลั่น 4.8 มิลลิลิตร

Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8	1.2 มิลลิลิตร
โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต	2.0 มิลลิลิตร
Glycerol	1.0 มิลลิลิตร
Bromophenol blue เข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v)	0.5 มิลลิลิตร

6. SDS reducing buffer

เตรียมโดยผสม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน stock sample buffer ที่มีปริมาตร 0.95 มิลลิลิตร ก่อนที่จะใช้

7. 5X-electrode (Running) buffer พีเอช 8.3

ประกอบด้วย

Tris-base	9	กรัม
Glycine	43.2	กรัม
โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต	3	กรัม

เจือจางให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

8. Catalyst

เตรียมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เข้มข้นร้อยละ 10 ก่อนที่จะนำมาใช้ และ TEMED (N,N,N'-tetramethyl ethylenediamine) ใช้ โดยตงโดยไม่ต้องทำให้เจือจางก่อน

9. การย้อมสีโปรตีนในเจลโดยวิธี Coomassie Brilliant Blue R-250

เตรียมสารละลายสีย้อม (Staining solution) คือ Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในเมทธานอลเข้มข้นร้อยละ 40 และกรดอะซิติก เข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำสารละลายสีย้อมมากรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายนี้สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

เตรียม Destain โดยประกอบด้วย เมทธานอลเข้มข้นร้อยละ 40 และกรดอะซิติก เข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

การเตรียมเจลเป็นชนิด slab gel

ประกอบชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel เตรียมสารละลายของ separating gel 17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำกลั่น 152.5 ไมโครลิตร Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 1.44 มิลลิลิตร โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 42.5 ไมโครลิตร และ Acrylamide-bis ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

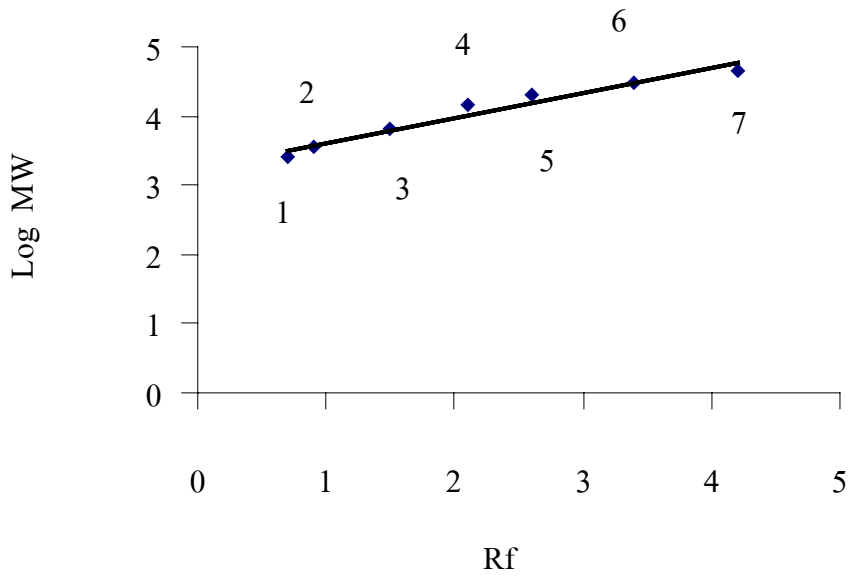
เทสารละลายเจลลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ แล้วค่อยๆ หยอดน้ำให้คลุมผิวเจล ทิ้งเจลไว้ให้แข็ง และเตรียม stacking gel เข้มข้นร้อยละ 4 โดยประกอบด้วยน้ำกลั่น 152.5 ไมโครลิตร Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 144 ไมโครลิตร โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และ Acrylamide-bis ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS) เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในส่วนของ separating gel เทน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลออกแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง สอด comb ลงในแผ่นกระจก เท stacking gel ที่เตรียมไว้ให้มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เหนือ separating gel ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ค่อยๆ ดึง comb ออกระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียม SDS-reducing buffer ตามปริมาณที่ต้องการใช้ โดยใช้ 2-mercapto-ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อ stock sample buffer ปริมาตร 0.95 มิลลิลิตร จากนั้นผสมตัวอย่างกับ SDS-reducing buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต้มสารละลายที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ก่อนนำไปใส่ในช่องบนเจล ต่อชุด อิเล็กโทรโฟลิซีส เติมบัฟเฟอร์โดยทำการเจือจาง 5X-electrode buffer ปริมาตร 60 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 240 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงใน chamber บน ให้คลุมผิวเจล และเติมบัฟเฟอร์ที่เหลือลงใน chamber ล่าง ใส่สารตัวอย่างในช่องเจลโดยค่อยๆ หยอดผ่านบัฟเฟอร์ลงไป แล้วต่อกระแสไฟฟ้าโดยใช้

กระแสไฟฟ้า 200 โวลท์ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของ separating gel ปิดกระแสไฟฟ้า นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาใส่ในถาดที่มีสารละลายสีย้อม (staining solution) ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างสีย้อมด้วย destain หลายๆ ครั้งจนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

ในกรณีของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารแบคเทอริโอซินสามารถหาได้โดยเปรียบเทียบ Mobilities ของโปรตีนนั้นๆ กับ Mobilities ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่ทำอิเล็กโทรโฟลิซีสไปพร้อมกัน



ภาพที่ 15 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

Figure 15 Protein standard curve by SDS-PAGE method

1 = Ovalbumin 2 = Carbonic anhydrase

3 = Trypsin inhibitor 4 = Lysozyme

5 = Aprotinin 6 = Isulin (b) chain

7 = Isulin (a) chain

ผลงานตีพิมพ์เผยแผร่จากวิทยานิพนธ์

ลัญจกร จันทร์อุดม, สุกัญญา จันทะชุม และ อรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2548. การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN11. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 27(3) : 817 - 824.

Junudom L. and Chanthachum S. 2004. Purification of Bacteriocin from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN11. 16th TSB Annual Meeting: Innovative Biotechnology: The Opportunity for Kitchen of the World. Pitsanulok, Thailand.