บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งของไลเปส

Bacillus sp. UN16a เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งแยกได้จากบริเวณบ่อดักไขมันจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ยูนิปาล์มอินดัสทรีจำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยคุณจุรีรัตน์ แซ่แต้ (2541) และเก็บเชื้อไว้ในอาหารเหลว nutrient broth ที่เติมกลีเซอรอล (glycerol) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อที่นำมาทดลองจะเลี้ยงไว้ในอาหาร Lipase Medium ซึ่งเป็นอาหารแข็งสูตรพื้นฐานที่ใช้สำหรับคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปส (กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการถ่ายเชื้อทุก 2 สัปดาห์

2. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวรับดีเอ็นเอเป้าหมาย (host cell)

Eschericia coli JM109 [($F^{/}$ traD36 lac^{q} Δ(lacZ)M15 $proA^{+}B^{+}$ / rpsL(Str^{r}) thr leu thi lacY galK galT ara fhuA dam dcm supE44Δ(lac-proAB)] ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ระวี เถียรไพศาล ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารสูตรพื้นฐานที่มีส่วนผสมของน้ำมันปาล์มเพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปส (Lipase Medium) ซึ่งเป็น selective medium สำหรับแบคทีเรียที่ย่อยไขมัน (กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532) (ภาคผนวก ก)

3.2 Yeast extract (Difco, USA)

3.3 Luria-Bertani medium (LB medium) (Difco, USA) (ภาคผนวก ก)

3.4 น้ำมันปาล์ม (plam oil) ยี่ห้อแวว

3.5 Tributyrin oil (Sigma)

4. DNA พาหะ (Vector)

พลาสมิด pUC18 ขนาด 2.9 kb ประกอบไปด้วยยีนดื้อยา ampicillin (Ap^r) และ lacZ เป็น marker

5. น้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานดีเอ็นเอ และโปรตีน

λDNA (GIBCO BRL, USA) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

Standard proteins marker ชนิด Low molecular weight (LMW) (Pharmacia)

6. เอนไซม์

*Hind*III (GIBCO BRL, USA)

*Bam*HI (GIBCO BRL, USA)

*Sau*3AI (GIBCO BRL, USA)

T_4 DNA ligase (GIBCO BRL, USA)

Proteinase K (GIBCO BRL, USA)

Lysozyme (GIBCO BRL, USA)

RNase (GIBCO BRL, USA)

7. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด Molecular biology grade และ analytical grade

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
Acrylamide	71.10	Bio Rad
Agarose	-	GIBCO BRL

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
Ammonium persulfate, $(NH_4)_2S_2O_8$	228.20	Sigma
Ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$	132.14	Fluka
Ammonium acetate, $CH_3COOHNH_4$	77.08	Merck
Ampicillin	-	Sigma
Acetic acid, CH_3COOH	60.05	Merck
Bovine serum albumin (BSA)	67,000	Sigma
Bromophenol blue, $C_{19}H_9Br_8NaO_5S$	691.97	Merck
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside (X-gal)	-	GIBCO BRL
Calcium chloride, $CaCl_2$	110.99	Fluka
Chloroform, $CHCl_3$	119.38	Merck
Citric acid, C_6H_8O $7H_2O$	210.14	Fluka
Coomassie brilliant blue R250	-	Fluka
Dibasic sodium phosphate, Na_2HPO_4 $2H_2O$	178.0	Fluka
Diethylaminoethyl sepharose, (DEAE-sepharose)	-	Pharmacia
Dimethyl formamide, C_3H_7NO	73.10	Sigma
Dipotassium hydrogenphosphate, K_2HPO_4	174.18	Merck
Ethanol, CH_3CH_2OH	46.07	Merck
Ethidium bromide, $C_{21}H_{20}BrN_3$	394.33	Merck
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	292.25	Merck
Ficoll 400	-	Fluka
Folin-Ciocalteau's phenol reagent	-	Merck
Glycerol, $C_3H_8O_3$	92.09	BDH
Glycine, $C_2H_5NO_2$	75.07	Bio Rad
Gum arabic	-	Sigma
Hydrochloric acid, HCl	36.46	J.T.Baker
Isopropanol, $(CH_3)_2CHOH$	60.10	Sigma

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
Isopropylthio-β-galactoside (IPTG)	-	GIBCO BRL
Magnesium chloride, $MgCl_2 .6H_2O$	203.31	Merck
Magnesium sulfate heptahydrate, $MgSO_4 .7H_2O$	246.48	Merck
Methanol, CH_3OH	32.04	Fluka
Monobasic sodium phosphate, $NaH_2PO_4 .2H_2O$	156.0	Fluka
2- Mercaptoethanol, C_2H_6OS	78.18	Merck
p-Nitrophenyl palmitate	-	Merck
Phenol,C_6H_5OH	94.11	Merck
Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)	174.2	Sigma
Potassium dihydrogenphosphate, KH_2PO_4	136.09	Merck
2-Propanol, $CH_3CH_2CH_2OH$	60.10	J.T.Baker
Sephardex G-100	-	Pharmacia
Sodium acetate, CH_3COONa	82.04	Merck
Sodium carbonate, Na_2CO_3	105.99	Merck
Sodium chloride, NaCl	29.2	Fluka
Sodium deoxycholate, $C_{24}H_{39}NaO_4$	414.57	Merck
Sodium dodecyl sulphate (SDS), $C_{12}H_{25}NaO_4S$	288.4	Sigma
Sodium hydroxide, NaOH	40.0	Merck
Sodium potassium tartrate,	-	Fluka
Sucrose, $C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	Merck
Tris[hydroxymethyl]aminomethane	121.11	Sigma
TritonX-100	-	Merck

อุปกรณ์

1. Refigerated centrifuge Type SCR 20 : Hitachi KOKI, Co,. LTD., Japan.
2. pH meter Model 320 : Mettler Teledo, Co,. LTD., Germany.
3. Homogenizer Golder 2F mill : APV Gautin Inc., Germany.
4. Spectrophotometer U-2000 : Hitachi KOKI, Co,. LTD., Japan.
5. Water bath Eyela : Tokyo Rikakikai Co,. LTD., Japan.
6. Peristatic pump : Bio-Rad Laboratoies., USA.
7. Fraction collector : Bio-Rad Laboratoies., USA.
8. Eppendorf centrifuge : Brinkmann Instruments Inc., Wesbury, N.Y., USA.
9. Bench-top centrifuge : Kokusan Enshinki Co., Tokyo, Japan.
10. Autoclaves : Tomy Seiko Co., Nerima-ku, Tokyo, Japan.
11. Enviromental incubator shaker : Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, Illinois, USA.
12. Electrophoresis power supply : Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA.
13. Electrophoresis Mini-Protein II-Bio-Rad Laboratories : Richmond, California, USA.
14. Hot air oven : Heraeus GmbH, Postfach, Hanau, Fernschreiber, Germany.
15. Incubator : Heraeus GmbH, Postfach, Hanau, Fernschreiber, Germany.
16. Laminar air flow : Gelman Science Pty. Ltd., Lane Cove, Sydney, New South Wales, Australia.
17. Micropipette : Socorex Issa. S.A., Lausanne Suisse, Switzerland.
18. Rotary evaporator Eyela SB-651 : Kokusan Enshinki Co., Tokyo, Japan.
19. Sonicator : Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA.
20. Sorvall superspeed centrifuge : Du pont Company, Welmington, Delaware, USA.
21. Stirring hot plate : Thermolyne Barnstead Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa, USA.
22. Vortex mixer : Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA.

วิธีวิเคราะห์

1. การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

วัดค่าการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส

วิเคราะห์กิจกรรมของไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีของ Hoshino และคณะ (1992) โดยใช้ *p*-Nitrophenyl palmitate (pNPP) เป็นสับสเตรท โดยค่า extinction coefficient เท่ากับ 15 $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$ (ภาคผนวก ข)

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้กรดพลามิติกอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ส่วนค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) ของเอนไซม์ หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้หารด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ในสภาวะที่กำหนด คูณด้วย 100

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ(1951) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) (ภาคผนวก ข)

4. การศึกษาความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)

4.1 การศึกษาความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) โดยดัดแปลงวิธีของ Laemmli (1970) (ตารางภาคผนวก จ1)

4.2 การศึกษาความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing Polyacrlamide Gel Electrophoresis, Native-PAGE) โดยดัดแปลงวิธีของ Davis (1964) (ตารางภาคผนวก จ2)

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยง และตรวจสอบกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

นำตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ของ *Bacillus* sp. UN16a ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ –80 องศาเซลเซียส มาแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ และตรวจสอบการผลิตไลเปส โดยวิธีการเขี่ยเชื้อ (streak plate method) บนอาหารสูตรพื้นฐานสำหรับการแยก และการเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 7) และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เกิดวงใสรอบโคโลนี เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงสำหรับใช้ในการสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ

2. การโคลนยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. UN16a

2.1 สกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. UN16a

ทำการสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. UN16a ดัดแปลงจากวิธีของ Meade และคณะ (1982) โดยเลี้ยง *Bacillus* sp. UN16a ใน Nutrient broth ที่มี yeast extract ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที (5,000 x g) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์มาผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที (5,000 x g) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกตะกอนเซลล์ เติม TES buffer (ภาคผนวก ค) ที่แช่เย็น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที (5,000 x g) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาตะกอนเซลล์มา เติม TE buffer (ภาคผนวก ค) ที่แช่เย็น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ TE buffer ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม Sodium lauryl sulfate-proteinase K (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมา สกัดด้วยสารละลายฟีนอลอิมตัว (saturated

phenol solution) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แยกเอาส่วนใสมาเติมแอมโมเนียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 0.54 เท่า ของปริมาตรของสารละลาย นำดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วย เอทธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วปั่นแยกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที (10,000 x g) เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอมาเติม DNA buffer (ภาคผนวก ค) ที่ผสมกับ RNAse (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผ่านการต้มเดือดเป็นเวลา 10 นาที) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.2 การย่อยเพียงบางส่วน (partial digestion) ของโครโมโซมัลดีเอ็นเอด้วย *Sau*3AI

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1 มาย่อยเพียงบางส่วนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI ดัดแปลงจากวิธีของ Priefer และคณะ(1984) โดยเตรียมหลอดทั้งหมด 6 หลอด โดยหลอดที่หนึ่งใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 40 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่เหลือใช้ดีเอ็นเอหลอดละ 20 ไมโครลิตร นำหลอดที่หนึ่งมาเติมบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ความเข้มข้น 10 เท่า (10X) ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 เท่า (1X) และเติม *Sau*3AI ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 ยูนิต และหลังจากนั้นถ่ายจากหลอดที่ 1 ไปยังหลอดที่สองด้วยปริมาตร 20 ไมโครลิตร ถ่ายส่วนผสมจากหลอดที่ 2 ไปยังหลอดที่ 3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และทำเช่นนี้ต่อไปจนครบทุกหลอด นำทั้งหกหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำมาวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ค) เพื่อคัดเลือกหลอดที่มีดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2-6 กิโลเบส

2.3 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* JM109

ทำการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยเขี่ยเชื้อ *E. coli* JM109 (อายุ 16-18 ชั่วโมง) ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) (ภาคผนวก ก) ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และนำมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ความเร็วที่ 5,000 รอบต่อนาที (2,000 x g) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาตะกอนเซลล์มา

เติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่แช่เย็น ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาแบ่งใส่หลอดๆละ 200 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

2.4 การสกัดเวคเตอร์

สกัดเวคเตอร์ pUC 18 ที่อยู่ใน *E. coli* JM109 ตามวิธีของ Holmes และ Quigley (1981) โดยนำ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pUC18 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB agar) (ภาคผนวก ก) ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลือกโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* JM109 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) ที่มี ampicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที (2,000 x g) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตะกอนเซลล์ที่แยกได้ละลายกับ STET (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลาย STET ที่มีไลโซไซม์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปแช่ลงในน้ำเดือดเป็นเวลา 60 วินาที ปั่นแยกเศษเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (10,000 x g) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกเอาเฉพาะส่วนใส เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (10,000 x g) เป็นเวลา 15 นาทีแยกเอาเฉพาะตะกอน ล้างตะกอนด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 2 ครั้ง โดยปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (10,000 x g) เป็นเวลา 3-5 นาที นำมาทำให้แห้งโดยการใส่ในโถดูดความชื้น (dessicator) เป็นเวลา 2-5 นาที นำมาเติมดีเอ็นเอบัฟเฟอร์ ที่มี RNAse ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.5 การตัด pUC18 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

นำ pUC18 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยใช้ pUC18 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่กำจัดไอออน (deionize water) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร, บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ความเข้มข้น 10 เท่า (10X) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Bam*HI

(5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็ง

2.6 การเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอกับเวคเตอร์ด้วยเอนไซม์ไลเกส

นำดีเอ็นเอ และเวคเตอร์ (pUC18) ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 และข้อ 2.5 ปริมาตร 10 และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วผสมรวมกัน นำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ความเข้มข้น 5 เท่า (5X) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 เท่า (1X) และเติมเอนไซม์ไลเกส (T_4 DNA ligase) 5-10 ยูนิต นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อาจเก็บ ligation mix นี้ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้งาน)

2.7 การถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยวิธีทรานฟอร์เมชั่น (Transformation)

ถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยวิธีทรานฟอร์เมชั่นตามวิธีของ O'Connell (1984) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* JM109 ที่เตรียมจากข้อ 2.3 มาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำมาถ่ายใส่หลอดที่มีดีเอ็นเอเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.6 แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดเซลล์ทั้งหมดลงไปในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) ที่มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูด 20, 50 และ 100 ไมโครลิตร ของส่วนผสมลงบนอาหารแข็ง (LB agar) ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ tributyrin oil ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี spread plate ที่มีการ spread สารละลายผสมของ IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) 4 ไมโครลิตร ที่ผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และ x-gal (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.8 การทดสอบการโคลนยีนไลเปสใน *E. coli* JM109

เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวที่เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB agar ที่ผสม tributyrin oil ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแอมพิซิลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการ spread สารละลายผสมระหว่าง IPTG

และ x-gal ซึ่งแสดงว่ามีดีเอ็นเอสอดแทรกเข้าไปในพลาสมิดเวคเตอร์ ส่วนโคโลนีสีฟ้าเป็นโคโลนีที่ไม่มีดีเอ็นเอสอดแทรก

3. การทำบริสุทธิ์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. UN16a

3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. UN16a 1 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยก และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ก่อนนำไปใช้

3.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส

ทำการเลี้ยง *Bacillus* sp. UN16a โดยใช้เชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.1 ปริมาณ 10% ของปริมาตรอาหารเหลวทั้งหมด และทำการเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ในสภาวะเดียวกับการเตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง โดยเก็บชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที (5,000 x g) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และทำการคัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมของไลเปสสูงที่สุดมาใช้ในการผลิตไลเปสในขั้นตอนถัดไป

3.3 ผลของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของไลเปส

ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UN16a ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสที่ได้จากข้อ 3.2 และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที (5,000 x g) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37, 4 และ –20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งเก็บไว้เป็นระยะเวลา 4 วัน โดยทำการวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปสที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน ตามลำดับ โดยคำนวนกิจกรรมของเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

3.4 การทำสารละลายเอนไซม์ให้เข้มข้นด้วยการระเหย

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.2 มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการระเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เท่า ของปริมาตรเดิม และแบ่งสารละลายที่ได้บางส่วนมาหากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และคณะ (1951) เทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (รูปภาคผนวก ข1) ส่วนสารละลายที่เหลือนำไปทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

3.5 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.4 มาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยแบ่งระดับความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ตกตะกอนโปรตีนตั้งแต่ 0-20%, 20-40%, 40-60% และ 60-80% ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข1) โดยค่อยๆเติมผงเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยอย่างช้าๆพร้อมกับการกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนได้ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 20% และนำสารละลายทั้งหมดมาปั่นแยกตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (8,000 x g) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และนำส่วนใสที่ได้หลังจากการแยกตะกอนโปรตีนมาทำการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อให้ได้ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 40, 60 และ 80% พร้อมกับปั่นแยกตะกอนโปรตีนในแต่ละช่วงตามลำดับ

3.6 การกำจัดเกลือโดยการไดอะไลซิส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.5 มาทำการกำจัดเกลือออกโดยบรรจุลงในถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ที่มีขนาดรูพรุน 12,000 (Molecular weight cut off 12,000 Da) และนำไปแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 โดยใช้สัดส่วนของสารละลายในถุงต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:50 ส่วน โดยมีการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ใหม่ใน 4 ชั่วโมงแรก นำสารละลายในถุงไดอะไลซีสมาปั่นแยกตะกอนอื่นๆที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อ

นาที (8,000 x g) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

3.7 การทำบริสุทธิ์ไลเปสโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange chromatography)

นำสารละลายเอนไซม์เฉพาะส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่ได้จากข้อ 3.6 มาผ่านเรซินแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-Sepharose CL-6B ซึ่งเป็น anion exchanger ซึ่งเตรียมโดยนำ DEAE-Sepharose CL-6B มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างต่อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 บรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.2 x 10 เซนติเมตร มีปริมาตรของเรซินในคอลัมน์เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วชะคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของเรซิน (bed volume) และนำสารละลายเอนไซม์ผ่านลงในคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของเรซิน ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร จนกระทั้งไม่มีโปรตีนออกมา จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย linear gradient elution ของโซเดียมคลอไรด์ ความข้มข้น 0-1 โมลาร์ ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟแฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีอช 8.0 จนไม่มีโปรตีนถูกชะออกมา นำสารละลายแต่ละหลอดมาหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และนำเอาส่วนของสารละลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์มารวมกัน และทำการกำจัดเกลือออกโดยการไดอะไลซิส ตามข้อ 3.3 และนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) และละลายกลับด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ก่อนนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนถัดไป

3.8 การทำบริสุทธิ์ไลเปสโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่น (gel filtration chromatography)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.7 มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยนำมาผ่านคอลัมน์ที่มีเจล Sephadex G-100 บรรจุอยู่ ซึ่งเตรียมโดยนำเจล Sephadex G-100 มาแช่ให้พองตัวด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแช่ต่อในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 อีก 5 ชั่วโมง ก่อนนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.0 x 45

เซนติเมตร มีปริมาตรเรซินในคอลัมน์เป็น 36 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรเรซินในคอลัมน์ และปรับสมดุลย์ของคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ล้างคอลัมน์ นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.7 มาเติมลงในคอลัมน์ และชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ปรับสมดุลย์โดยใช้อัตราการไหลของตัวชะเท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายเอนไซม์หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์ที่เก็บได้แต่ละหลอดมาหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.9 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์มาศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ใช้แผ่นเจลชั้นบน (stacking gel) และ แผ่นเจลชั้นล่าง (separating gel) ความเข้มข้น 4% และ 12% ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก จ1) สภาวะการทดลองจะใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ ประมาณ 45 นาที แล้วเปลี่ยนความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 150 โวลต์ ประมาณ 45 นาที หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซีสวัดแถบสีโบรโมฟีนอลบลู และติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนตัวอย่าง และโปรตีนมาตรฐานในแผ่นเจล โดยนำแผ่นเจลมาย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู (Coomassie brilliant Blue R-250 (ภาคผนวก จ) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ และ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ชุด Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit ของบริษัท Pharmacia ซึ่งใช้สำหรับโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 14,400-94,000 ดาลตัน ประกอบไปด้วยโปรตีน 6 ชนิด คือ แอลฟาแลคตัลบูมิน (α-lactalbumin), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean inhibitor), คาร์โบนิคแอนไฮเดรส (carnonic anhydrase), โอวัลบูมิน (ovalbumin), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA), ฟอสฟอร์รีเลสบี (phosphorylase b) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14,400, 20,100, 30,000, 43,000, 67,000 และ 94,000 ดาลตัน ตามลำดับ และหาค่า Rf ซึ่งเป็นค่าระยะทางของโปรตีนต่อระยะทางของสีจากความสัมพันธ์

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสีโบรโมฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นนำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) กับ log ของน้ำหนักโมเลกุลในกระดาษกราฟ เปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเอนไซม์กับกราฟมาตรฐานเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

3.10 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และน้ำหนักโมเลกุลโดยประยุกต์วิธีของ Davis (1968) โดยเตรียมโพลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเจลชั้นบน (stacking gel) และ 10-15 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเจลชั้นล่าง (separating gel) โดยส่วนประกอบของแผ่นเจลแสดงดังตารางภาคผนวก จ2) สภาวะการทดลองจะใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 180 นาที หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซีส วัดแถบสีโบรโมฟีนอลบลู และติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนตัวอย่าง และโปรตีนมาตรฐานในแผ่นเจล โดยนำแผ่นเจลมาย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู (Coomassie brilliant Blue R-250) วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่าง และแถบโปรตีนมาตรฐาน คำนวนหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนตัวอย่าง และโปรตีนมาตรฐาน

นำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log ของนำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานชุด Low Molecular Weight (LMW) ซึ่งใช้สำหรับโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 14,400-94,000 ดาลตัน (Da) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน 6 ชนิด ได้แก่ แอลฟาแลคตัลบูมิน (α-lactalbumin), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean inhibitor), คาร์โบนิคแอนไฮเดรส (carnonic anhydrase), โอวัลบูมิน (ovalbumin), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA), ฟอสฟอร์รีเลสบี (phosphorylase b) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14,400, 20,100, 30,000, 43,000, 67,000 และ 94,000 ดาลตัน ตามลำดับ นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลในสภาพธรรมชาติของเอนไซม์

4. การศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของไลเปส

4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ โดยบ่มเอนไซม์ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 35, 45, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

4.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของไลเปส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่าง ๆ คือ (sodium citrate buffer, pH 4.0-6.0), (phosphate buffer, pH 7.0-8.0), (Tris-HCl buffer, pH 9.0) และ (glycine-NaOH buffer, pH 10.0-11.0) โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.1 คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

4.3 ความคงตัวของไลเปสที่พีเอชต่างๆ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาไดอะไลซิสในน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างๆกันคือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยคำนวณกิจกรรมที่ได้ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

4.4 ความคงตัวของไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.3 และบ่มสารละลายเอนไซม์ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 35, 45, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำสารละลายเอนไซม์มาทำให้เย็นโดยแช่ในถาดน้ำแข็ง จากนั้นนำมาวิเคราะห์หากิจกรรม

ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.1 และ 4.2 คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

4.5 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมของไลเปส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ นำสารละลายเอนไซม์ผสมกับสับสเตรท และตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ chloroform, isooctane, hexane, benzene, acetone, butanol, ethanol และ methanol ให้มีความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์เป็น 10% (v/v) ก่อนนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

4.6 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความคงตัวของไลเปส

นำสารละลายไลเปสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ (ข้อ 4.5) ในสัดส่วน 1:1 และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดส่วนใสที่มีสารละลายเอนไซม์ละลายอยู่นำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

4.7 ผลของไอออนโลหะที่มีต่อกิจกรรมของไลเปส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จากข้อ 4.2 และนำมาเติมสารละลายไอออนโลหะต่างๆ ได้แก่ NaCl, KCl, $CaCl_2$, $BaCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$ และ $FeCl_3$ ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยบ่มสารละลายทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จากข้อ 4.1 เป็นเวลา 15 นาที คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์

4.8 ผลของสารเคมีที่มีต่อกิจกรรมของไลเปส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จากข้อ 4.2 และศึกษาผลของสารเคมีชนิดต่างๆที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Phenylmethyl sulfonylfluoride (PMSF), 2-

Mercaptoethanol และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) โดยทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาผลของไอออนโลหะที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จากข้อ 4.7 โดยใช้สารเคมีที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 1 มิลลิโมลาร์ ก่อนนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปกิจกรรมสัมพัทธ์