2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

กุ้งตัวอย่าง

กุ้งที่ใช้ในการศึกษาคือ กุ้งแชบ๊วยที่มีขนาดลำตัวยาว 10-14 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 40 กรัม และอยู่ในระยะคราบแข็ง (ไม่อยู่ในระยะลอกคราบ) จับจากทะเลอันดามัน แล้วเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ที่สถานีประมงชายฝั่งจังหวัดตรัง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Fluka
Ammonium persulphate	Merck
Bisacrylamide (N,N′-methylene diacrylamide)	Fluka
Bovine serum albumin	Sigma Chemical Co.
Bromophenol blue	Merck
Calcium chloride	Ajex Chemicals
Citric acid	Ajex Chemicals
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma Chemical Co.
Coomassie plus protein assay reagent kit	Pierce
Copper sulphate	Merck
DEAE-Sephacel	Sigma Chemical Co.
N-Acetyl-β-D-glucosamine	Sigma Chemical Co.
Dimethylsulphoxide	Lab scan

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Ethanol	BDH AnalaR
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fluka
Ethylene glycol monomethyl ether	Sigma Chemical Co.
Fast garnet GBC	Sigma Chemical Co.
Glycerol	Sigma Chemical Co.
Glycine	Fluka
Hydrochloric acid	Merck
Magnesium chloride	Univar
β-Mercaptoethanol	Fluka
Methanol	Merck
Naphthol As-Bi N-acetyl-β-D-glucosaminide	Sigma Chemical Co.
p-Dimethyl-aminobenzaldehyde	Sigma Chemical Co.
p-Nitrophenol	Sigma Chemical Co.
p-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide	Sigma Chemical Co.
Phenylmethylsulphonyl fluoride	Fluka
Potassium tetraborate	Ajax Chemical
Sephadex G-200	Pharmacia
Silver stain Kit	Bio-Rad
Sodium carbonate	Carlo erba
Sodium chloride	Fluka
Sodium citrate	Carlo erba
Sodium dodecyl sulphate	Riedel-de Haen
Sodium hydroxide	Fluka
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma Chemical Co.
Triton X-100	Merck

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	GT410	Ohaus
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-5	Mettler
Centrifuge	5415C	Eppendorf
Centrifuge	5804R	Eppendorf
Micropipette	-	Gilson
Microtube pump MP-3	MP-3N	Eyela
pH meter	Accumet 15	Fisher Scientific
Power supply	1000/500	Bio-Rad
Slab gel electrophoresis apparatus	AE-6400	Atto
UV-VIS spectrophotometer	160A	Shimadzu
Vortex	G-560E	Scientific Industries

วิธีการ

2.1 การเตรียมซีรัมจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

ดูดฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแชบ๊วยทันทีหลังจับขึ้นมาด้วยกระบอกฉีดยาขนาด1 มิลลิลิตร และเข็มขนาด 24G ความยาว 1 นิ้ว จากบริเวณ pericadium หรือขาเดินคู่ที่ 3 เก็บฮีโมลิมฟ์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ฮีโมลิมฟ์แข็งตัว นำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 10 นาที เก็บส่วนใส หรือซีรัม (serum) ไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.2 การเตรียมสารสกัดจากเนื้อเยื่อของกุ้ง

ตัดเนื้อเยื่อจากกุ้งไปชั่งน้ำหนักแล้วนำใส่หลอด homogenizer เติม 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มี 0.9% NaCl และ 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) (TBS-PMSF) โดยใช้อัตราส่วนเนื้อเยื่อ 1 กรัม : TBS 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ให้เซลล์แตก ดูดใส่หลอด eppendoff ขนาด 2 มิลลิลตร และนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกตะกอนและไขมันทิ้งไป นำส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดเนื้อเยื่อแบ่งใส่หลอด หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 °ซ

2.3 การหาปริมาณโปรตีน

2.3.1 ตามวิธีของ Bradford (1976)

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างด้วยชุดหาโปรตีน (Coomassie plus protein assay reagent kit) จากบริษัท Pierce ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่างในปริมาณที่เหมาะสม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายชุดหาโปรตีน 1 มิลลิลิตร โดยทำควบคู่ไปกับ BSA (bovine serum albumin) จากบริษัท Pierce ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเจือจาง BSA ให้มีปริมาณโปรตีน 3-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer

2.3.2 ตามวิธีของ Lowry *et al*. (1951)

หาปริมาณโปรตีนโดยทำการเจือจาง BSA ที่เป็นโปรตีนมาตรฐานให้มีปริมาณโปรตีนเป็น 20, 40, 80 และ 100 ไมโครกรัม เติมสารละลายแอลคาไลน์ (2% $NaCO_2$ ใน 0.1 N NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติม Folin-Phenol (ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (A 650) ด้วยเครื่อง UV –Vis spectrophotometer

2.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส

ในการหาภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Jeuniaux (1966) ได้ใช้ colloidal chitin เป็นสับเสตรท ในบัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เหมาะสม บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ เวลาที่เกิดปฏิกิริยาและปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นทำการเติม $K_2B_4O_7$ และหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกตะกอนออก นำส่วนใสไปเติม *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB ที่เตรียมในสารละลาย HA ซึ่งได้แก่ 10 N HCl 2.4 มิลลิลิตร ผสมกับ conc acetic acid 97.6 มิลลิลิตร) และน้ำกลั่นจนครบ 1.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เพื่อเป็นการเร่งปฏิกิริยาให้ผลผลิต N-acetylglucosamine ที่เกิดขึ้น ทำปฏิกิริยากับ DMAB จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร (A585) นำค่าที่ได้ไปหาแอคทิวิทีของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ N-Acetyl-D-glucosamine (NAG)

2.4.1 การเตรียม 10% colloidal chitin

ละลายไคตินผงที่สกัดมาจากแกนปลาหมึก 0.2 กรัม ใน 50% sulfuric acid ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นที่เย็นจัด 100 มิลลิลิตร และปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 10 N NaOH จนเกิดตะกอน เก็บสารผสมนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารผสมไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ นาน 15 นาที โดยล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3 ครั้ง และล้างตะกอนด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 อีกประมาณ 2 ครั้ง วัดปริมาตรตะกอนแล้วปรับปริมาตรตะกอนเป็น 10%

2.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา NAG

2.4.2.1 การหาปริมาตรสารละลาย HA และน้ำกลั่นที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ DMAB

นำสารละลาย 1 mM NAG ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และเติม 0.7 M $K_2B_4O_7$ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร หลังจากนั้นต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติม 5% DMAB

100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย HA ปริมาตร 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 และ 900 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นในทุกหลอดให้มีปริมาตรทั้งหมดเป็น 1.2 มิลลิลิตร บ่มสารผสมที่ 37 °ซ นาน 50 นาที แล้ววัดค่า A585

2.4.2.2 การหาความเข้มข้นของ DMAB ที่เหมาะสม

นำสารละลาย 1 mM NAG ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาตามวิธีการข้อ 2.4.2.1 ต้มเป็นเวลา 10 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติม 5% DMAB ปริมาตร 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย HA ให้มีปริมาตรครบ 0.9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นหลอดละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 50 °ซ นาน 20 นาที แล้ววัดค่า A585

2.4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนส

2.4.3.1 การหาชนิดของสับเสตรทไคตินที่เหมาะสม

นำไคตินผงที่ได้จากแกนปลาหมึก เปลือกกุ้ง และกระดองปู อย่างละ 5 มิลลิกรัม (ไคตินทั้ง 3 ชนิด ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.อุตส่าห์ จันทร์อำไพ) ผสมกับสารสกัดตับที่เจือจาง 1:5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 ปริมาตร 550 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 45 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.7 M $K_2B_4O_7$ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร หลังการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำสารผสมนี้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสจากแต่ละหลอด แบ่งใส่หลอดใหม่ 2 หลอด หลอดละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปเติม 0.71% DMAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ให้มีปริมาตรครบ 1.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 50 °ซ นาน 20 นาที แล้ววัดค่า A585

2.4.3.2 การเปรียบเทียบรูปแบบของไคตินจากแกนปลาหมึกต่อการเป็นสับเสตรทที่เหมาะสม

ในการเปรียบเทียบรูปของไคตินต่อการเป็นสับเสตรทที่เหมาะสม ใช้ 10% colloidal chitin ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (5 มิลลิกรัม) และไคตินผง 5 มิลลิกรัม นำไคตินแต่ละรูปแบบผสมกับสารสกัดตับ (1:5) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ

0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 ให้มีปริมาตรครบ 600 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 45 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.7 M $K_2B_4O_7$ แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.4.3.1

2.4.3.3 การหาปริมาตรของ colloidal chitin ที่เหมาะสม

นำสับสเตรท 10% colloidal chitin ปริมาตร 50, 100, 200, 300, 400และ 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดตับ (1:5) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรทุกหลอดเป็น 600 ไมโครลิตร ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 แล้วบ่มที่ 45 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.7 M $K_2B_4O_7$ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.4.3.1

2.4.3.4 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนสโดยใช้ 10% colloidal chitin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดตับที่เจือจาง 1:5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 25-60 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.4.3.3

2.4.3.5 การหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

นำสารสกัดตับ (1:5) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปทำปฏิกิริยากับสารผสม ตามวิธีการข้อ 2.4.3.4 แล้วนำไปบ่มที่ 45 °ซ เป็นเวลาต่าง ๆ กันในช่วง 0-6 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.4.3.3

2.4.3.6 การหาค่า pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

หา pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้ 10% colloidal chitin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดตับที่เจือจาง 1:5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆโดยที่ค่า pH 3-6 ใช้ 0.1M sodium acetate buffer ส่วนที่ pH 6-9 ใช้ 0.1M Tris-HCl ปริมาตรบัฟเฟอร์ละ 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.7 M $K_2B_4O_7$ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.4.3.3

2.4.3.7 การหาปริมาณสารสกัดตับที่เหมาะสม

นำ 10% colloidal chitin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดตับที่เจือจาง 1:5 ปริมาตรต่าง ๆ ในช่วง 0-100 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรทุกหลอดเป็น 600 ไมโครลิตร ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.4.3.3

2.6 การหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส

2.5.1 การทำกราฟมาตรฐาน N-Acetyl glucosamine (NAG)

นำสารละลาย 2 mM NAG ปริมาตร 0-60 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรทุกหลอดเป็น 80 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ 0.7 M $K_2B_4O_7$ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร หลังการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม 0.71% DMAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร ให้มีปริมาตรครบ 1.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 50 °ซ นาน 20 นาที แล้ววัดค่า A585

2.5.2 การหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 10% colloidal chitin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่ 45 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.7 M $K_2B_4O_7$ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำสารผสมนี้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสจากแต่ละหลอด แบ่งใส่หลอดใหม่ 2 หลอด หลอดละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปเติม 0.71% DMAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ให้มีปริมาตรครบ 1.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 50 °ซ นาน 20 นาที แล้ววัดค่า A585

นำค่า A585 ที่ได้ไปหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ NAG กำหนดให้ค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ 1 หน่วย (unit) เท่ากับจำนวน 1 นาโนโมล (nmole) ของ NAG ที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายได้จากไคตินในเวลา 1 ชั่วโมง

2.6 การหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase โดยใช้ *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (*p*NP-NAG) เป็นสับสเตรท ตามวิธีการที่รายงานโดยสุวรรณา ผลใหม่ (2547) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Godknecht และ Honegger (1991) ดังนี้ ใช้สารละลายเอนไซม์ในปริมาณที่เหมาะสมผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 mM *p*NP-NAG ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6 ปริมาตรรวมเป็น 200 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M Na_2CO_3 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่า A420 ของผลผลิต คือ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น โดยใช้ *p*-nitrophenol ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งกำหนดให้แอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase 1 หน่วย เท่ากับปริมาณ 1 ไมโครโมล (μ mole) ของ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ต่อเวลา 1 นาที

2.7 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10x12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือเจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูง 7 เซนติเมตร

2.7.1 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 6-12% ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel 3% (5 ml)	Separating gel	
		6%(3ml)	12%(3ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.5 ml	0.60 ml	1.20 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.63 ml	-	-

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.50 ml	1.50 ml
10% Ammonium persulphate	50 μl	30 μl	30 μl
TEMED	5 μl	3 μl	3 μl
Distilled water	3.82 ml	0.87 ml	0.27 ml

2.7.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) เตรียมโปรตีนมาตรฐานเหมือนกับการเตรียมสารตัวอย่าง

2.7.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่าง ปิดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.7.2 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS, sodium dodecyl sulphate) ตามวิธีของ Laemmli (1970) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล (6-18%) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

Composition	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5 ml)	6% (3ml)	18% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.5 ml	0.60 ml	1.80 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	0.75 ml	0.75 ml
0.2 M EDTA	50 μl	30 μl	30 μl

10% SDS	50 µl	30 µl	30 µl
10% Ammonium persulphate	50 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl	3 µl
Distilled water	3.10 ml	1.56 ml	0.36 ml

2.7.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล, 4% SDS และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู ในกรณีที่ทำ SDS-PAGE สภาพรีดิวซ์ (reduce) ทำโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 1 ส่วน ดังข้างต้น แต่มี1% เบตา-เมอร์แคปโตเอธานอล (β-mercaptoethanol) ด้วย จากนั้นต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที

2.7.2.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องเจลส่วนบน ใช้ 0.025 M Tris-0.192 M glycine-0.1% SDS, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ นำเจลไปย้อมสี

2.7.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE)

preparative PAGE เป็น nondenaturing PAGE แต่มีการเตรียมเจลให้มีขนาด 10 x 12เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจลส่วนบน 3% และเจลส่วนล่าง 6-12% เจลส่วนบนเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่าง 12 ช่อง จากนั้นผสมสารละลายเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง นำสารละลายที่ได้เติมลงในช่องใส่สารตัวอย่าง แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 15 mA ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ จากนั้นตัดเจลตรงกลาง เป็นแถบกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาวตลอดแผ่นเจล นำชิ้นเจลไปย้อมด้วยสารละลาย Bradford (0.01% Coomassie brilliant blue G-250 - 4.7% ethanol - 8.5% phosphoric acid) นาน 5-10 นาที เมื่อปรากฏแถบโปรตีนนำไปเทียบกับเจลซึ่งไม่ย้อม

แล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบโปรตีนที่ต้องการ แล้วชะโปรตีนนั้นออกจากชิ้นเจล โดยนำชิ้นเจลที่ต้องการใส่ในถุงไดแอไลซ์ (dialysis bag) แล้วนำไปวางตามขวางในเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอน ซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ (submarine) เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA เมื่อครบ 18 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดแอไลซ์ (dialyse) แล้วทำให้เข้มข้น

2.7.4 การย้อมสีโปรตีนแบบซิลเวอร์ (Silver stain)

หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส นำเจลไปตรึงโปรตีนด้วย 40% เมธานอล (methanol)-10% กรดน้ำส้ม(acetic acid) นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลาย 10% เอธานอล (ethanol) -5% กรดน้ำส้ม นาน 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นใช้ชุดย้อมซิลเวอร์ (silver stain kit) ของบริษัท Bio-Rad โดยเติมสารละลายออกซิไดเซอร์ (oxidizer solution) เขย่านาน 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน (deionized water) ครั้งละ 5 นาที จนกระทั่งสีเหลืองในเจลหมดไป จากนั้นแช่เจลในน้ำยาซิลเวอร์ (silver reagent) นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดไอออน นาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายดีวีโลเปอร์ (developer) เขย่าและเปลี่ยนสารละลายเมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ และเมื่อปรากฏแถบของโปรตีน หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% กรดน้ำส้ม

2.7.5 การย้อมแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ใน Nondenaturing PAGE

เตรียมสารละลายย้อมแอคทิวิที ตามวิธีการของ Peters และคณะ (1998) โดยละลาย naphthol-AS-Bi-N-acetyl-β-D-glucosaminide 6.5 มิลลิกรัม ใน ethylene glycol monomethyl ether ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และละลาย Fast Garnet GBC 22.5 มิลลิกรัมใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 ชนิดผสมกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 นำเจลที่ได้จากการทำ nondenaturing PAGE ไปบ่มในสารละลายที่เตรียมได้ ที่ 50 °ซ นาน 2 ชั่วโมง จะปรากฏแถบของเอนไซม์ NAGase สีน้ำตาลเข้ม จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 25% เมธานอล-10% กรดน้ำส้ม นาน 5 นาที

2.7.6 การหาแถบโปรตีนของเอนไซม์ NAGase ใน Nondenaturing PAGE

นำสารละลายเอนไซม์ NAGase เข้มข้นไปทำ nondenaturing PAGE หลังจากนั้นตัดแผ่นเจลออกเป็น 2 ส่วน นำส่วนแรกไปย้อมสีโปรตีนด้วยสารละลาย

Bradford นาน 5-10 นาที เมื่อปรากฏแถบโปรตีนนำไปเทียบกับเจลซึ่งไม่ย้อมแล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบโปรตีนที่ต้องการ ตามวิธีการข้อ 2.7.3 นำเจลแต่ละชิ้นบดใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ นาน 30 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาแอคทิวิทีตามวิธีการข้อ 2.6 จากผลดังกล่าวทำให้ทราบว่าโปรตีนแถบใดเป็นเอนไซม์ NAGase

2.8 การทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากตับ

2.8.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เตรียม DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด 2.6 x 9 เซนติเมตร มีปริมาตรของเรซิน (resin) เป็น 50 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ ด้วย 0.2 M sodium citrate-0.2% Triton X-100 (Wallace, 1965) แล้วปรับคอลัมน์ให้สมดุลย์ (equilibrate) ด้วย TB (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดตับที่มีปริมาณโปรตีน 404.67 มิลลิกรัม ที่ผ่านการไดแอไลซ์ด้วยบัฟเฟอร์ TB-PMSF (TB-1 mM PMSF) แล้วล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกล้างออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ล้างคอลัมน์จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่อง (linear gradient) ในช่วง 0-0.5 M ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม (75 มิลลิลิตร + 75 มิลลิลิตร) ชะในทำนองเดิมต่อด้วย 0.5-1.0 M NaCl (75 มิลลิลิตร + 75 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิม และเก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และหาแอคทิวิที ทำการรวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นทำให้เข้มข้นในถุงไดแอไลซ์ด้วย CM-cellulose จนสารละลายในถุงไดแอไลซ์เหลือเพียงเล็กน้อย นำไปไดแอไลซ์ด้วย TB-PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ จากนั้นนำไปหาแอคทิวิที หาปริมาณโปรตีนและทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE และแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200

2.8.2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-200

ล้างและปรับคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.6 x 84 เซนติเมตร) ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 170 มิลลิลิตร ให้สมดุลย์ด้วย TB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นจากคอลัมน์ DEAE-sephacel ที่มีปริมาณโปรตีน 4.98 มิลลิกรัม ซึ่งผ่านการไดแอไลซ์ด้วย TB-PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ มาแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ปรับให้มีอัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และหาค่าแอคทิวิที ทำการรวมหลอดที่มีแอคทิวิทีสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น แล้วไดแอไลซ์ด้วย TB-PMSF นาน 18 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ จากนั้นนำไปหาแอคทิวิที หาปริมาณโปรตีน และทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE และนำสารละลายที่ได้ไปแยกต่อด้วยการทำ preparative PAGE

2.8.3 โดย Preparative PAGE ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาตร 1,300 ไมโครลิตร (640 ไมโครกรัม) ไปแยกต่อโดย preparative PAGE ตามวิธีการข้อ 2.7.3 โดยตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมตามขวางเฉพาะแถบเอนไซม์ NAGase ซึ่งทราบได้จากการทดลองในวิธีการข้อ 2.7.5. หรือ 2.7.6 จากนั้นทำการชะเอนไซม์ NAGase ออกจากชิ้นเจล โดยนำชิ้นเจลที่ต้องการใส่ในถุงไดแอไลซ์ แล้วนำไปวางตามขวางในเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสตามแนวนอน ซึ่งมีบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 ท่วมทุกถุงแบบใต้น้ำ เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15 mA เมื่อครบ 18 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดแอไลซ์ ทำให้เข้มข้น หาปริมาณโปรตีน หาแอคทิวิทีและทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase โดยวิธี nondenaturing PAGE

นำสารละลายเข้มข้นที่แยกได้จาก ครั้งที่ 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (40 ไมโครกรัม) ไปแยกต่อโดย preparative PAGE ครั้งที่ 2 อีกครั้ง จากนั้นหาปริมาณโปรตีน หาแอคทิวิทีและทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase

2.9 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์

2.9.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE

หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase ใน SDS-PAGE ตามวิธีการข้อ 2.7.2 โดยการทำควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ myosin (M_r 205,000) β-galactosidase (M_r 119,000) BSA (M_r 98,000) ovalbumin (M_r 57,300) carbonic anhydrase (M_r 36,800) soybean trypsin inhibitor (M_r 30,100) lysozyme (M_r 22,000) และ aprotinin (M_r 7,600) หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสและย้อมโปรตีนแล้ว วัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐาน และแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่า R_f ไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase ได้

2.9.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ ในสารผสมปฏิกิริยาตามวิธีการข้อ 2.6 ที่อุณหภูมิ 25, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 และ 90 °ซ นาน 15 นาที แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.6

2.9.3 การหา pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

ทำการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ในสารผสมปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH แตกต่างกันในช่วง 3-9 โดยใช้ 0.1 M sodium acetate ในช่วง pH 3-6 และ 0.1 M Tris-HCl ในช่วง pH 6-9 แล้วทำในต่อตามวิธีการข้อ 2.6

2.9.4 การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิ

นำเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70 °ซ นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปหาแอคทิวิทีตามวิธีการข้อ 2.6 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ซึ่งเก็บไว้ที่ 0 °ซ

2.9.5 การศึกษาจลนศาสตร์

ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ NAGase ต่อสับสเตรท โดยใช้เอนไซม์ NAGase ทำปฏิกิริยากับ *p*NP-NAG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 mM จากนั้นนำไปทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.6 แล้วคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า 1/V และ1/[S]

2.10 การศึกษาระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase และไคติเนสต่อการติดเชื้อของแบคทีเรียที่ก่อโรคกุ้ง

2.10.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้ง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองคือ *Vibrio harveyi* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร tryptic soy agar ที่มี 1.5 % NaCl ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณเชื้อโดยเลี้ยงในอาหารเหลว (tryptic soy broth) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นำเชื้อไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียใน 0.85% NaCl นำไปเซนตริฟิวจ์ ล้างตะกอนและเตรียมแบคทีเรียในบัฟเฟอร์ดังกล่าวให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-0.9 หน่วย แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ต่อไป

2.10.2 การวัดระดับของเอนไซม์ NAGase และไคติเนสในกุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi*

เลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในถังพลาสติคกลมความจุ 25 แกลลอน (gallon) โดยเตรียมถังก่อนเลี้ยงกุ้งดังนี้ ล้างถัง ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนและทิ้งให้แห้งอย่างน้อย 2 วัน จากนั้นใส่น้ำทะเลที่มีคลอรีนฆ่าเชื้อปริมาตรประมาณครึ่งถัง ลงในถัง ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 1 อาทิตย์ แล้วนำกุ้งที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งมีน้ำหนักประมาณตัวละ 25 กรัม ลงเลี้ยงถังละ 4 ตัว โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในถัง นาน 1 อาทิตย์ โดยสังเกตพบว่ากุ้งแข็งแรงไม่มี

อาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงไว้ใน tryptric soy broth (จากข้อ 2.10.1) ไปเซนตริฟิวจ์ ล้างตกตะกอนด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl) และเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น $2.5x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งที่เป็นชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ เก็บฮีโมลิมฟ์และตับของกุ้งก่อนการฉีด (เวลา 0 ชั่วโมง) และของกุ้งหลังการฉีดที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง แล้ววัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase และไคติเนสในฮีโมลิมฟ์และตับ โดยทำการสกัดตับตามวิธีข้อ 2.2 เก็บสารสกัดตับส่วนใสไปหาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase และเอนไซม์ไคติเนสของกุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อหรือชุดควบคุม รวมทั้งนำตับของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม ไปทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธีตรวจสอบการเรืองแสงของเชื้อในที่มืดโดยดัดแปลงวิธีของ Jiravanichpaisal และ Miyazaki (1994) ซึ่งทำโดยชั่งน้ำหนักตับ 0.1 กรัม นำไปบดและเจือจางในสารละลาย 1.5% NaCl ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง TCBS (thiosulphate citrate bile salt) ที่มี 1.5% NaCl แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นดูการเรืองแสงสีเขียวของเชื้อในที่มืด

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในข้อ 2.10.2 โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (one way analysis of variance, ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์ความสัมพันธ์ SPSS (statistical package for the social science)