ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรใน 1 ลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 กรัม

1. TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT AGAR (TGE)

bacto beef extract	3	กรัม
bacto tryptone	5	กรัม
bacto dextrose (glucose)	1	กรัม
bacto agar	15	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น แล้วละลาย agar โดยใช้ความร้อนเพียงเล็กน้อย จนใสนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส)

2. TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT สูตรดัดแปลง

bacto beef extract	3	กรัม
bacto tryptone	5	กรัม
soluble starch, (Difco)	10	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น แล้วละลาย agar โดยใช้ความร้อนเพียงเล็กน้อย จนใสนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส)

3. NUTRIENT AGAR (NA)

bacto beef extract	3	กรัม
bacto peptone	5	กรัม
bacto agar	15	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น แล้วละลาย agar โดยใช้ความร้อนเพียงเล็กน้อย จนใสนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส)

4. NUTRIENT BROTH (NB)

bacto beef extract	3	กรัม
bacto peptone	5	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 (ปอนด์/ตารางนิ้ว) (121 องศาเซลเซียส)

5. SKIM MILK AGAR

nutrient agar (NA)	23	กรัม
skim milk	8	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นำ NA ละลายลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และ skim milk ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส) นำ skim milk ที่ฆ่าเชื้อแล้วเทผสมลงใน NA ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันดี

6. SKIM MILK BROTH

nutrient broth (NB)	8	กรัม
skim milk	8	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นำ NB ละลายลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และ skim mlik ละลายลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส) นำ skim mlik ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เทลงใน NB ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันดี

7. STARCH AGAR

bacto beef extract	3	กรัม
soluble starch (Difco)	10	กรัม
bacto agar	12	กรัม
distilled water	1,000	ลิตร

เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น แล้วละลาย agar โดยใช้ความร้อนเพียงเล็กน้อย จนใสนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส)

สารเคมี

1. สารละลาย casein 1%

ละลาย casein 1 กรัม ลงในสารละลาย beffer pH ที่ต้องการ 50 มิลลิลิตร ต้มในหม้อต้มน้ำ คนจนกว่า casein ละลายประมาณ 15 นาที ทำให้สารละลาย casein เย็นลงแล้วปรับความเป็นกรดด่าง ตามต้องการ ด้วย NaOH หรือ HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย buffer สารละลาย casein นี้ต้องเก็บไว้ในตู้เย็น

2. สารละลาย hemoglobin 3%

ละลาย hemoglobin 3 กรัมลงใน buffer pH ที่ต้องการ แล้วปรับ pH โดยใช้สารละลาย NaOH หรือ HCl และเติมสารละลาย buffer pH ที่ต้องการให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายแป้ง 2%

ละลายแป้ง (soluble starch) 2 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่กำลังเดือดลงไป 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรใน ขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (ไม่ควรเตรียมไว้ค้างคืน ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

4. สารละลายไอโอดีนสำหรับทดสอบการย่อยแป้ง

crystal iodine	1	กรัม
potassium iodide	2	กรัม
ethyl alcohol	30	มิลลิลิตร
distilled water	300	มิลลิลิตร

ผสม crystal iodine กับ potassium iodide เข้าด้วยกันเติมน้ำเล็กน้อย เพื่อให้ผลึกละลาย จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 300 มิลลิลิตร และ ethyl alcohol 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง ถ้าเก็บสารละลายไว้นานจนเป็นสีเหลืองไม่ควรใช้ทดสอบ

5. สารละลาย 3,5 - Dinitrosalicylic acid (DNS)

3, 5 - Dinitrosalicylic acid	1	กรัม
Rochell salt (Na, K - tartrate)	30	กรัม
2 N NaOH	20	มิลลิลิตร

ละลาย 3,5 - Dinitrosalicylic acid 1 กรัม ในสารละลาย 2 N NaOH 20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร เติม Rochell salt 30 กรัม คนจนละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

6. สารละลาย Buffer

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ

6.1 Citrate Buffer

Stock Solutions

A: 0.1 M solution of citric acid (21.01 g in 1,000 ml)

B: 0.1 M solution of sodium citrate (29.41 g C H O Na_3- $2H_2O$ in 1,000 ml ;

the use of the salt with 5 1/2 H_2O is not recommended)

X ml of A+Y ml of B, diluted to a total of 100 ml

pH	3.0	3.2	3.4	3.6	3.8	4.0	4.2	4.4	4.6	4.8
X	46.5	43.7	40.0	37.0	35.0	33.0	31.5	28.0	25.5	23.0
Y	3.5	6.3	10.0	13.0	15.0	17.0	18.5	22.0	24.5	27.0

pH	5.0	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2
X	20.5	18.8	16.0	13.7	11.8	9.5	7.2
Y	29.5	32.0	34.0	36.3	38.2	41.5	42.8

6.2 Phosphate Buffer

Stock Solutions

A: 0.2 M solution of monobasic sodium phosphate(27.8 g in 1,000 ml)

B: 0.2 M solution of dibasic sodium phosphate (53.65 g of Na_2HPO_4 $7H_2O$ or 71.7 g of Na_2HPO_4 $12H_2O$ in 1,000 ml)

X ml of A+Y ml of B, diluted to a total of 200 ml

pH	5.7	5.8	5.9	6.0	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7
X	93.5	92.0	90.0	87.7	85.0	81.5	77.5	73.5	68.5	62.5	56.5
Y	6.5	8.0	10.0	12.3	15.0	18.5	22.5	26.5	31.5	37.5	43.5

pH	6.8	6.9	7.0	7.1	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6	7.7	7.8
X	51.0	45.0	39.0	33.0	28.0	23.0	19.0	16.0	13.0	10.5	8.5
Y	49.0	55.0	61.0	67.0	72.0	77.0	81.0	84.0	87.0	90.5	91.5

pH	7.9	8.0
X	7.0	5.3
Y	93.0	94.7

6.3 Tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris) Buffer

Stock Solutions

A: 0.2 M solution of tris(hydroxymethyl)aminomethane (24.2 g in 1,000 ml)

B: 0.2 M HCl (HCl 23.2 ml + H_2O 195.36 ml)

50 ml of A+X ml of B, diluted to a total of 200 ml.

pH	9.0	8.8	8.6	8.4	8.2	8.0	7.8	7.6	7.4	7.2
X	5.0	8.1	12.2	16.5	21.9	26.8	32.5	38.4	41.4	44.2

6.4 Glycine-NaOH Buffer

Stock Solution

A: 0.2 M solution of glycine (15.01 g in 1,000 ml)

B: 0.2 M NaOH

50 ml of A+X ml of B, diluted to a total of 200 ml

pH	8.6	8.8	9.0	9.2	9.4	9.6	9.8	10.0	10.4	10.6
X	4.0	6.0	8.8	12.0	16.8	22.4	27.2	32.0	38.6	45.5

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

สารเคมี

0.1 M buffer pH (ภาคผนวก ก) ที่ต้องการทดลอง

5 % Trichloroacetic acid (TCA)

1 % casein (ใช้ทดสอบเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในช่วง pH 6.0 ขึ้นไป)

3 % hemoglobin (ใช้ทดสอบเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในช่วง pH 3.0 - 6.0)

0.4 N NaOH

2.0 N Folin-Cieocalteau dilute 1:2

วิธีการ

1.ใส่เอนไซม์ (ตัวอย่างทดสอบ) อาจเป็นเอนไซม์ที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ทำให้อุ่นในหม้อต้มน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (3 นาที)

2.ใส่สารละลาย casein ซึ่งทำให้อุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ลงไปในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วเริ่มจับเวลา โดยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเป็นเวลา 10 นาที

3. หลังจากนั้น 10 นาที จึงเติม TCA ลงไป หลอดละ 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 30 นาที (สำหรับ control ทำเช่นเดียวกันเพียงแต่ใส่ TCA ลงไปก่อนสารละลาย casein)

4. ทำการกรองตะกอนออกโดยใช้ กระดาษกรอง Whatman No.1

5. ใช้ปิเปตดูดส่วนใสที่กรองได้ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร

6. เติม NaOH ลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย mixer

7. นำหลอดทดลองไปไว้ในหม้อต้มน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. เติม Folin-cieacalteau ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย mixer ทิ้งไว้ 10 นาที
9. หลังจากนั้น 10 นาที จะมีสีเกิดขึ้น แล้วนำไปวัดสีที่ความยาวเคลื่อน 660 นาโนเมตร

การเตรียม standard tyrosin curve

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน tyrosin โดยการเตรียม tyrosin 1 nM โดยการชั่ง tyrosin 18.1 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask หยด HCl ลงไป 2-3 หยด เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารละลาย tyrosin มาทำให้เจือจางดังตารางข้างล่างนี้ ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปทำตามขั้นตอนตั้งแต่ข้อ 6-9 แล้วนำไปเขียน standard curve ระหว่าง OD และความเข้มข้นของ tyrosin

tyrosin concentration	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	nM
tyrosin solution	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	ml
H_2O	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0	ml
	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

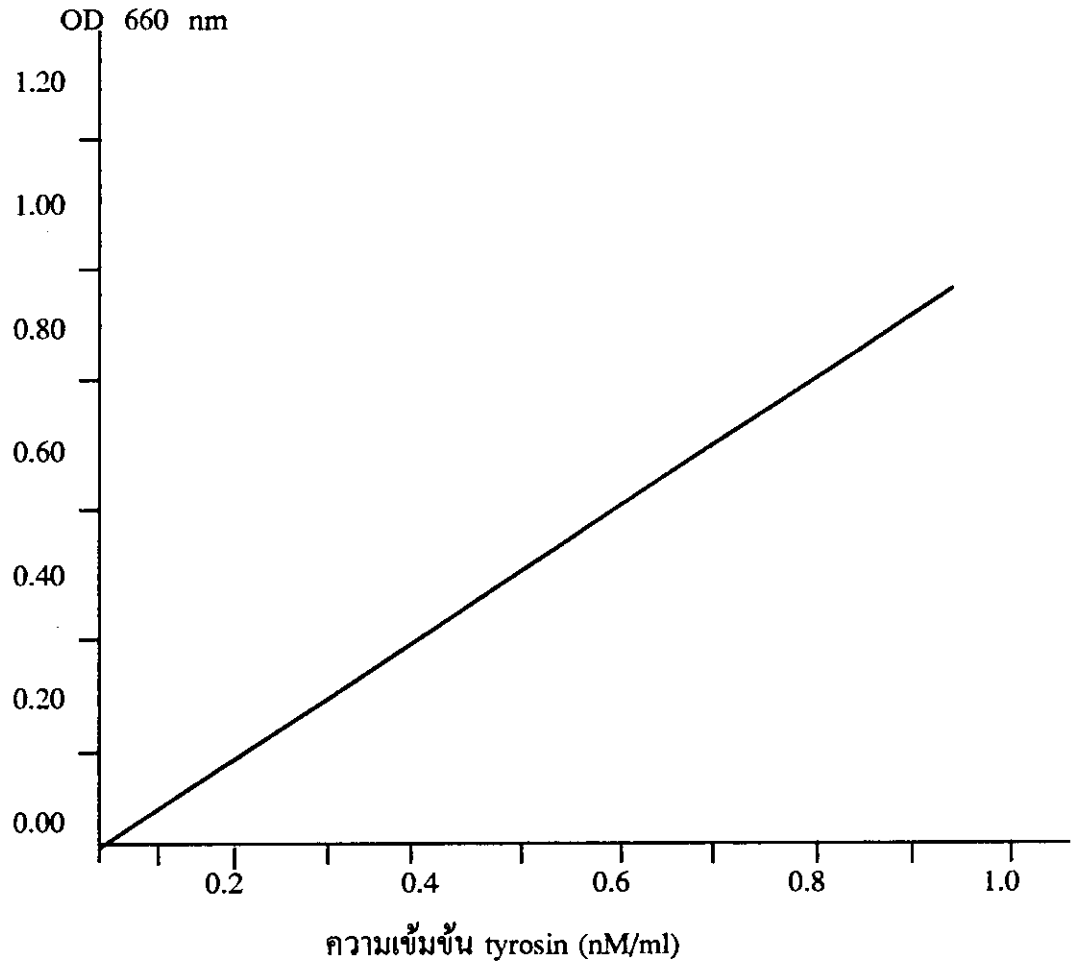
1 หน่วยเอนไซม์ (Enzyme Unit, EU) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้สารใหม่ซึ่งอยู่ในอัตราเท่ากับ tyrosin 1 milliequivalent ต่อ ml ต่อ นาทีภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

$$\frac{EU \times 10^{-3}}{ml} = \frac{OD \times \text{dilution enzyme} \times \text{total volume}}{10 \text{ นาที}}$$

ความเข้มข้นของสารละลาย tyrosin กับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลาย tyrosin มาตรฐาน (nM/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD660 nm)
0.1	0.143
0.2	0.293
0.4	0.482
0.6	0.708
0.8	0.972
1.0	1.160

กราฟมาตรฐาน tyrosin



2. การหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายมอลโตสมาตรฐาน

ชั่งสารละลายมอลโตสด้วยเครื่องชั่งละเอียดให้ได้ประมาณ 0.2 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตรเก็บเป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจาง ให้ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2 สารละลาย 3,5 - Dinitrosalicylic acid (DNS)

2.1.3 สารละลาย 0.02 M phosphate buffer

2.1.4 สารละลายน้ำแป้ง 2%

2.2 กราฟมาตรฐานมอลโตส

2.2.1 ดูดสารละลายมาตรฐานมอลโตส 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในสารละลาย 3,5 - Dinitrosalicylic acid 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.2 นำไปต้มเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยผ่านน้ำประปา

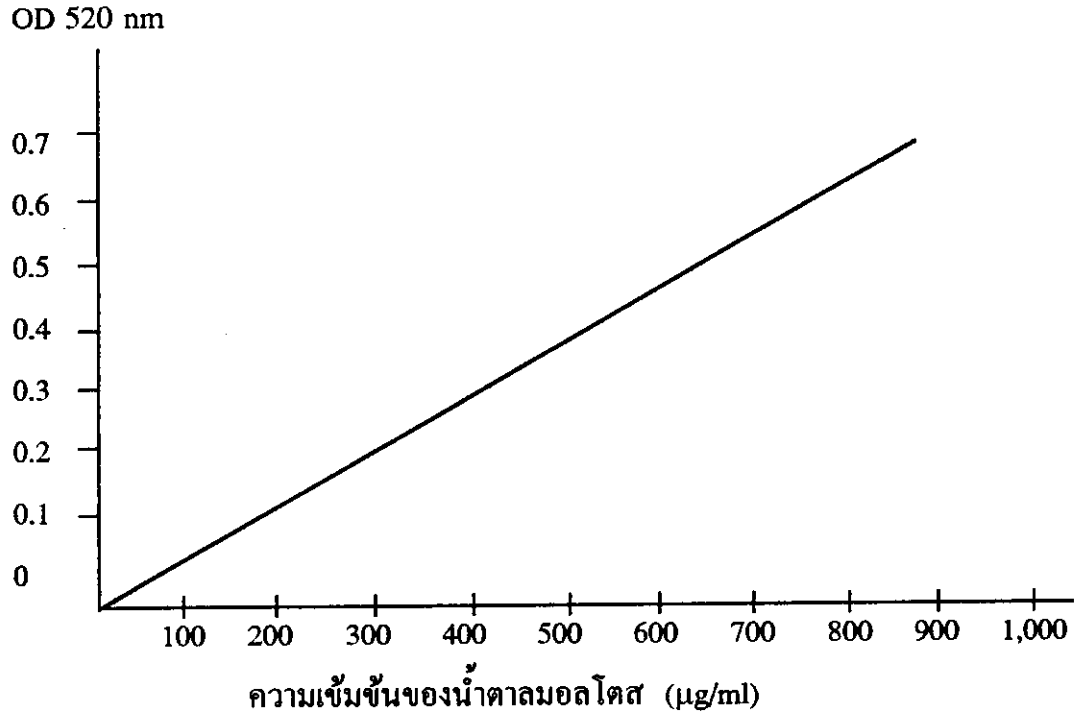
2.2.3 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.2.4 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง

ความเข้มข้นของสารละลายมอลโตสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารละลาย มอลโตสมาตรฐาน (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD 520 nm)
1,000	0.665
725	0.487
500	0.329
250	0.164
125	0.081
62.5	0.042
0	0.000

กราฟมาตรฐานมอลโตส



2.3 วิธีวิเคราะห์ กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง

2.3.1 ดูดสารละลายแป้ง 3 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 7 2 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 5 นาที

2.3.2 ดูดสารละลายเอนไซม์ใส่ลงไป 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน

2.3.3 ณ. นาทีที่ 0 และ 20 ดูดสารละลายในส่วนผสมมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลาย 3,5 - Dinitrosalicylic acid 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.3.4 นำไปใส่ในน้ำที่กำลังเดือด 5 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยผ่านน้ำประปา

2.3.5 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.3.6 นำค่าการดูดกลืนแสง (OD520) ที่ได้ที่เวลา 20 นาที ลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 0 นาที เทียบกับกราฟมาตรฐาน

1 หน่วย ของเอนไซม์ย่อยแป้งเท่ากับไมโครโมลของน้ำตาลมอลโตสที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 นาที โดยสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง