รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ปานใจ วงศ์วิริยะ, 2542 การแยกเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณสมบัติทนความร้อนและศึกษาสมบัติของเชื้อ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีรารัตน์ นาประดิษฐ์, 2544 การแยกแบคทีเรียที่สร้างโปรติเอสทนความร้อน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วทัญญุตา ภู่โยธิน, 2544. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็ม *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุรีย์ ฟูตระกูล, ภาวณี คณาสวัสดิ์ และสุมนทิพย์ จันทร์ฟัก, 2536. การพัฒนาการผลิตและการใช้เอนไซม์โปรติเอสโดยเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรีย, รายงานการวิจัย เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ภาษาอังกฤษ

Aunstrup,K. 1979. Proteinases. Appl. Biochem Bioeng. 2:49-114.

Barrett, A. 1990. The classes of proteolytic enzymes. In Dalling, M.J. Plant Proteolytic Enzymes. Baca Ratoh, Florida: CRC Press. 1: 1-16.

Barett, A. J. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods Enzymol. 244:1-15.

Boonyaras Sookkheo, S. Sinchaikul, S. Phutrakul, and Chen, S.T. 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33 Protein. Expr. Purif. 20 (2): 142-151

Chiplonkar, J. M., Gangodkar, S. V., Wagh, U. V. , Ghadge, G. D, Rele, M. V. and Srinivasan, M. C. 1985. Applications of alkaline protease from *Coridiobolus* in small animal cell culture. Biotechnol. Lett. 7:665-668.

Choi, I.G., Bang, W. G., Kim, S. H. and Yu, Y. G.1999. Extremely thermostable serine-type protease from *Aquifex pyrophilus*. J. Biol. Chem. 274:881-888.

Cowan, D. 1992. Biotechnology of the Archaea. Trends Biotechnol, 10: 305-323

Cowan, D., Danie, R. and Morgan, H. 1985. Thermophilic proteases: Properties and potential applications. Trends Biotechnol. 3:68-72.

Chopra, A.K. and Mathur, D.K. 1985 Purification and characterization of heat-stable proteases from *Bacillus stearothermophilus* RM-67. J. Dairy. Sci. 68 (12): 3202-3211

Chung, J.M., Chung, I.Y. and Lee, Y.S. 2002. The purification and characterization of a *Bacillus stearothermophilus* methionine aminopeptidase (MetAP) J Biochem. Mol. Biol. 35 (2): 228-35

Feder, F. and Schuck, J. M. 1970. Studies on *Bacillus subtilis* neutral-protease and *Bacillus Thermoproteolyticus* thermolysin-catalyzed hydrolysis of dipeptide substrates. Biochem. 9:2784-2791.

Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D. and Sineriz, F.1996.Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, production and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5 (3): 327-332.

Fujii, M., Takagi, M., Imanaka, T. and Aiba, S. 1983. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 154:831-837.

Fusek, M., Lin, X. and Tang, J. 1990. Enzymic properties of Thermopsin. J. Biol. Chem. 265: 1496-1501.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R., and Phillips, G.B. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. p.409-443.

Gey, M.H. and Unger, K.K.1995. Calculation of the molecular masses of two newly synthesized thermostable enzymes isolated from thermophilic microorganisms. J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.666 (1): 188-193.

Godfrey, T. and West, S. 1996. Industrial enzymology, 2nd ed., Macmillan Publisher Inc., New York, N. Y.

Hagihara, B. Matsubara, H., Nakai, M. and Okunuki, K. 1958. Crystalline bacterial proteinase I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. J. Biochem. 45:185-194.

Herbert ,R. A. 1992. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles, Trends Biotechnol., 10: 395-400

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology.9th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins company

International Union of Biochemistry. 1992. Enzyme nomenclature. Academic Press, Inc., Orlando. Fla.

Jung, H.J., Kim, H.and Kim, J.I.1999. Purification and characterization of Co^{2+}-activated extracellular metalloprotease from *Bacillus* sp JH108. J. Microbiol. Biotechnol.9 (6): 861-869.

Keay, L., and Wildi, B. S. 1970. Protease from Genus Bacillus I Neutral proteases. Biotechnol. Bioeng. 12:179-212.

Kim, Y. O., Lee, J. K., Sunitha, K., Kim, H. K. and Oh, T. K. 1999. Minor thermostable alkaline protease produced by *Thermoactinomyces* sp. E79. J. Microbiol. Biotechnol. 9:469-474.

Kumar, C. G., Tiwari, M. P. and Jany, K. D. 1999. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic Bacillus sp.: Purification and some properties. Process. Biochem. 34: 441-449.

Kusek, T. W. and Kinsella, J. E. 1988. Properties and potential applications of a unique heat-stable protease. Food Techol. 42:102-106.

Leaemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Lee, J. K.,Kim, Y. O., Kim, H. K., Park, Y. S. and Oh, T. K. 1996. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and the DNA sequence of the encoding gene. Biosci. Biotech. Biochem. 60:840-846.

Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 267-275.

Lu, S.F. and Chang, P.P. 1996. A thermostable neutral protease from *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541 Lett. Appl. Microbiol. 22 (1): 5-9

Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R. and Eijsink, V. G. H. 1997. Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. J. Biol. Chem. 272:11152-11156.

Matsuzawa, H., Hamaoki, M. and Ohta, T. 1983. Production of thermophilic extracellular proteases (Aqualysins I and II) by *Thermus aquaticus* YT-1, an extreme thermophile. Agric. Biol. Chem. 47(1):25-28.

Matta, H., and Punj, V. 1998. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. Int. J. Food. Microbiol. 42 (3): 139-145

Matta., H., Punj, V. and Kalra, M.S. 1994. Isolation and pratial characterization of a heat-stable extracellular protease from Pseudomonas sp. AFT-36. Milchwissenschaft milk science international 49 (4): 186-189

Millet, J. 1970 Characterization of Protease Excreted by *Bacillus subtilis* Marbury Strain during Sporulation, J. Appl. Bacteriol., 33: 207-219

Morihara, K. 1974. Comparative specificity of microbial proteinases. Adv. Enzymol. 41:179-243.

Murao, S., Nomura, Y., Nagamatsu, K., Hirayama, K., Iwahara, M. and Shin, T. 1991. Purification and some properties of a thermostable metal proteinase produced by *Thermomicrobium* sp. KN-22 strain. Agric. Biol. Chem. 55:1739-1744.

Nongporn Hutadilok-towatana, A. Painupong and P. Suntinanalert. 1999. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS719, J. Biosci. Bioeng., 87: 581-587

Ohta, H., Katoh, T. and Fujio, Y.1995. Purification and some properties of a thermostable protease, BSP2, produced from *Bacillus stearothermophilus* No 2. J. Fac. Agri. Kyushu University. 40 (1-2): 9-17.

Ohta, Y. 1967. Thermostable protease from thermophilic bacteria. J. Biol. Chem. 242(3) :509-515.

Okamoto, M., Yonejima, Y., Tsujimoto, Y. Suzuki, Y. and Watanabe, K. 2001. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic Bacillus sp. strain MO-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 103-108.

O'Leary, W. M. 1989. Practical handbook of microbiology. Boca Raton : CRC Press.

Outtrup , H. and Boyce, C.O.L. 1990. Microbial proteinases and biotechnology. 2nd. Fogarty, M.W., and Kelly, C.T. (eds). Elsevier Applied Science. London.

Peter, H. A. S. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 2. Baltimore : The Williams & Willikins Company.1986.

Poutanen, K. 1977. Enzymes: An important tool in improvement of the quality of cereal foods. Trends. Food Sci. Technol. 8:300-306.

Prescott, M., Peek, K. and Daniel, R.M. 1995. Characterization of a thermostable pepstatin-nisensitive acid proteinase from a *Bacillus* sp. Int. J. Biochem. Cell Biol. 27:729-739.

Rahman, R. N. Z. A., Razak, C. N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, W. M. Z. W. and Salleh, A. B. 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. Appl. Nicrobiol. Biotechnol. 40:822-827.

Rao, M. B., Tanksale, A. M. , Ghatge, M. S.and Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62:597-635

Sarath, G., Rebecca, S. De La M. and Wagner, W.W. 1989. Protease assay methods. Proteolytic enzymes : a practical approach. Beynon, R.J. and Bond, J.S. (eds) Oxford : IRL Press: 25-55

Schokker, E.P. and vanBoekel, M.A.J.S. 1997. Production, purification and partial characterization of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22 Food Int. dairy. J. 7 (4): 265-271.

Schmacher, G.F.B. and Schill, W.B. 1972. Anal. Biochem. 152:39.

Scopes, R. K.1994 Protein purification : principles and practice 3rd ed. New York : Springer.

Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechol. 33:519-523.

Takii, Y., Urata, Y.and Ueno, N. 1998. Thermostable neutral protease resembling thermolysin derived from Bacillus brevis MIB001. Biosci. Biotech. Biochem. 62 (5): 1028-1030

Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Sakashita, H. and Kimura, T. 1992. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Biosci. Biotech. Biochem. 56:246-250.

Uehara, H., Yamane, K. and Maruo, B. 1979. Thermosensitive, extracellular neutral proteases in *Bacillus subtilis*: isolation, characterization, and genetics. J. Bacteriol. 139:583-590.

Venter, H., Osthoff, G.and Litthauer, D. 1999. Purification and characterization of a metalloprotease from *Chryseobacterium indologenes* Ix9a and determination of the amino acid specificity with electrospray mass spectrometry Protein. Expr. Purif. 15 (3): Page 282-95

Voorhorst, W.G.B., Eggen, R. I. L., Geerling, A. C. M., Platteeuw, C., Siezen, R. J. and de Vos, W. M. 1996. Isolation and characterization of the hyperthermostable serine protease, Pyrosin, and its gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. 271:20426-20431.

Wu, L. C. and Hang, Y. D. 1998. Purification and characteriztion of acid proteinase from *Neosartorya fischeri* var. *spinosa* IBT 4872. Lett. Appl. Microbiol. 27:71-75.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

<u>อาหารเหลว BY (BY medium) ที่มี 1 % skim milk ต่อ 1 ลิตร</u> แยกเตรียมเป็น 2 ส่วน ประกอบด้วย

ส่วนที่ 1

สิ่งสกัดจากเนื้อ	5.0	กรัม
สิ่งสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม

เติมน้ำเป็น 500 มล. ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ส่วนที่ 2

skim milk powder	10.0	กรัม

เติมน้ำเป็น 500 มล. ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที นำมาเทรวมกันด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

<u>อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (phenol red broth base)</u>

โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
สิ่งสกัดจากเนื้อ	1.0	กรัม
ฟีนอลเรด	0.018	กรัม
คาร์โบไฮเดรต	1%	(w/v)

เติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล. ปรับ pH เป็น 6.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

<u>อาหารเหลวไนเตรต (nitrate broth)</u>

โปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3)	1.0	กรัม
สิ่งสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารเหลวเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium)

โปรติโอสเปปโตน	5.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
ไดโปรแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

อาหารเหลวอินโดล (Indole broth)

เปปโตน	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 20 นาที

อาหารแข็งสตาร์ช (Starch agar)

แป้งมันฝรั่ง	1.0	กรัม
สิ่งสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
วุ้งผง	20.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

อาหารเหลวไธโอไกลโคเลต (Thioglycolate broth)

เปปโตน	20.0	กรัม
แอล-ซีสทีน (L-Cystine)	0.25	กรัม
กลูโคส	6.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.5	กรัม
โซเดียมไธโอไกลโคเลต	0.5	กรัม
โซเดียมซัลไฟต์	0.1	กรัม
วุ้งผง	0.7	กรัม

เติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล. ปรับ pH เป็น 7.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test medium)

สิ่งสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
เปปโตน	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
วุ้นผง	4.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล. นำอาหารไปหลอมให้เข้ากันแล้วจึงเติม

ไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์	0.05	กรัม

นำไปต้มเดือดนาน 1 นาที นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

อาหารทดสอบการใช้ซิเตรต (Simmons citrate medium)

แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
โมโนแอมโมเนียมฟอสเฟต	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	1.0	กรัม
โซเดียมซิเตรต	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
บรอมไทมอลบลู	0.08	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นเป็น 1000 มล. ปรับ pH เป็น 6.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายแกรมคริสตอลไวโอเล็ต (Gram's crytal violet solution)

สารละลาย ก		
คริสตอลไวโอเล็ต	2.0	กรัม
เอทธานอล 95 %	20	มล.
สารละลาย ข		
แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มล.

ผสมสารละลาย ก และ ข ที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1.0	กรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

สารละลายแกรมซาฟรานินโอ (Gram's safranin staining solution)

ซาฟรานิน	0.25	กรัม
เอทธานอล 95 %	10	มล.
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายซาฟรานินในเอทธานอล แล้วจึงเติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

สารละลายมาลาไคท์กรีน (Malachite green)

มาลาไคท์กรีน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายโคแวคส์

พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์	5.0	กรัม
เอมิลหรือบิวธิลแอลกอฮอล์	75	มล.
กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น	25	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายอัลฟา แนพธิลามีน เข้มข้น 0.5 % (0.5% α-naphthylamine)

อัลฟา แนพธิลามีน	0.5	มล.
5 N กรดอะซิติก	100	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

สารละลายกรดซัลฟานิลิกเข้มข้น 0.8 % (0.8% sulfanilic acid)

กรดซัลฟานิลิก	0.8	มล.
5 N กรดอะซิติก	100	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)

Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3.0	ลิตร

Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

Lowry D

สารละลายโฟลินฟีนอล(Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>สารละลายทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ 0.05 M pH 7.0</u>

ทรีสมาร์ เบส 60.55 กรัม

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. แล้วปรับ pH ให้เป็น 7.0 โดยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 M เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1000 มล.

<u>สารละลาย 1% เคซีน (1% casein) ใน 0.05 M ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.0</u>

แฮมมาร์สเตน เคซีน (Hammarsten casein) 0.25 กรัม

เติมน้ำกลั่น 20 มล. ปรับ pH ให้เป็นด่าง (เคซีนละลายได้ดีในด่าง) เขย่าหรือคนให้เคซีนละลาย แล้วปรับ pH เป็น 7.0 และเติม

0.5 M ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.0 2.5 มล.

ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มล. ด้วยน้ำกลั่น

<u>สารละลายสำหรับใช้ในการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส</u>

สารละลายทริสไกลซีนอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส 9.0 กรัม

ไกลซีน 43.2 กรัม

ปรับ pH เป็น 8.3 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 600 มล.

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 M

ทริส 6.0 กรัม

ปรับ pH เป็น 6.8 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มล.

สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 M

ทริส 18.15 กรัม

ปรับ pH เป็น 6.8 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.60	กรัม
N,N'-เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-Methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มล.

ใส่สารทั้งสองในน้ำกลั่นที่บรรจุในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง ปิดฝาและเขย่าให้ละลายได้มากที่สุด ควรใส่ถุงมือทุกครั้งที่ใช้ และเตรียมใหม่ทุก 30 วัน

บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

น้ำกลั่น	19.0	มล.
0.5 M สารละลายทริส pH 6.8	5.0	มล.
กลีเซอรอล	4.0	มล.
2-เมอร์แคบโตเอธานอล	2.0	มล.
สารละลาย 1% บรอมฟีนอลบลู	2.0	มล.

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มล.

เตรียมใหม่ทุก 24 ชม.

สารละลายผสมเซพาเรติงเจล ความเข้มข้น 12 %

น้ำกลั่น	3.45	มล.
1.5 M สารละลายทริส pH 8.8	2.5	มล.
สารละลายอะคริลาไมด์	4.0	มล.
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายผสมสแตกกิงเจล ความเข้มข้น 4 %

น้ำกลั่น	6.2	มล.
1.5 M สารละลายทริส pH 8.8	2.5	มล.
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มล.
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

<u>สารละลายสำหรับใช้ในการทำอิเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลพอลิอะคริลาไมด์เจล</u>

สารละลายทริสไกลซีนอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 8.3 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ 600 มล.

สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 10 %

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	10.0	มล.

บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

น้ำกลั่น	19.0	มล.
0.5 M สารละลายทริส pH 6.8	5.0	มล.
กลีเซอรอล	4.0	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10%	8.0	มล.
2-เมอร์แคบโตเอธานอล	2.0	มล.
สารละลาย 1% บรอมฟีนอลบลู	2.0	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายผสมเซพาเรติงเจล ความเข้มข้น 12 %

น้ำกลั่น	3.45	มล.
1.5 M สารละลายทริส pH 8.8	2.5	มล.
สารละลายอะคริลาไมด์	4.0	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10%	100.0	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

สารละลายผสมสแตกกิงเจล ความเข้มข้น 4 %

น้ำกลั่น	6.2	มล.
1.5 M สารละลายทริส pH 8.8	2.5	มล.
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มล.
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %	50.0	ไมโครลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10%	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

สารละลายผสมเซพาเรติงเจล ความเข้มข้น 12 % ที่มีเคซีน 1 %

น้ำกลั่น	2.45	มล.
1.5 M สารละลายทริส pH 8.8	2.5	มล.
สารละลายอะคริลาไมด์	4.0	มล.
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10%	100.0	ไมโครลิตร
สารละลายเคซีน 10 %	1.0	มล.
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	5.0	ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	0.1	%
เมธานอล	40.0	%
กรดอะซิติก	10.0	%

สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining solution)

เมธานอล	40.0	%
กรดอะซิติก	10.0	%

สารละลายที่ใช้ในการย้อมสีเจลแบบซิลเวอร์สเตนนิง*

สารละลายฟิกเซชัน

เอธานอล	100.0	มล.
กรดอะซิติก	25.0	มล.

เติมน้ำปลอดประจุ (Deionized water) ให้ได้ปริมาตร 250 มล.

สารละลายเซนซิไทซิง

เอธานอล	75.0	มล.
กลูตาร์ไดอัลดีไฮด์ (Glutardialdehyde)** (25% น้ำหนักต่อปริมาตร)	1.25	มล.
โซเดียมไธโอซัลเฟต (5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	10.0	มล.
โซเดียมอะซิเตต	17.0	กรัม

เติมน้ำปลอดประจุ (Deionized water) ให้ได้ปริมาตร 250 มล.

สารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยาซิลเวอร์

สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (2.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	25.0	มล.
ฟอร์มาลดีไฮด์ ** (37% น้ำหนักต่อปริมาตร)	0.1	มล.

เติมน้ำปลอดประจุ (Deionized water) ให้ได้ปริมาตร 250 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายเดเวลอปปิง

โซเดียมคาร์บอเนท	6.25	กรัม
ฟอร์มาลดีไฮด์ **	0.05	มล.
(37% น้ำหนักต่อปริมาตร)		

เติมน้ำปลอดประจุ (Deionized water) ให้ได้ปริมาตร 250 มล.

สารละลายสตอปปิง

$EDTA\text{-}Na_2 \cdot 2H_2O$	3.65	กรัม

เติมน้ำปลอดประจุ (Deionized water) ให้ได้ปริมาตร 250 มล.

* ควรใส่ถุงมือตลอดการทำงานเนื่องจากป้องกันการปนเปื้อนโปรตีนจากมือ และป้องกันสารที่เป็นพิษ

** เติมสารนี้ก่อนใช้งานเท่านั้น

<u>วิธีย้อมสีโปรตีนในพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยซิลเวอร์*</u>

ฟิกเซชั่น

นำเจลที่ต้องการย้อมมาเติมสารละลายฟิกเซชันในถาดพลาสติก เขย่าเบาๆเพื่อไม่ให้เจลติดก้นถาด เขย่านาน 30 นาทีจึงเทสารละลายฟิกเซชันออก

เซนซิไทซิง

เติมสารละลายเซนซิไทซิงในถาดพลาสติก เขย่าเบาๆนาน 30 นาทีจึงเทสารละลายเซนซิไทซิงออก ล้างเจลด้วยน้ำปลอดประจุ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (เขย่าเบาๆ) แล้วเทน้ำออก

ปฏิกิริยาซิลเวอร์

แช่เจลในสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยาซิลเวอร์ เขย่าเบาๆเพื่อไม่ให้เจลติดก้นถาด เขย่านาน 20 นาทีจึงเทสารละลายออก แล้วล้างเจลด้วยน้ำปลอดประจุ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที (เขย่าเบาๆ) แล้วเทน้ำออก

เดเวลอปปิงและสตอปปิง

เติมสารละลายเดเวลอปปิงในถาด เขย่าเบาๆนาน 2-5 นาทีหรือจนเริ่มเห็นแถบโปรตีนจางๆ(หรือสารละลายเดเวลอปปิงเริ่มเป็นสีดำ) รีบเทเดเวลอปปิงออกทันที (ถ้าเทออกเพราะสารละลายเดเวลอปปิงเริ่มเป็นสีดำ และยังไม่เห็นแถบโปรตีนให้เติมสารละลายเดเวลอปปิงลงไปใหม่) เติมสารละลายสตอปปิง เขย่าเบาๆนาน 10 นาที แถบโปรตีนจะเริ่มเห็นชัดเจนขึ้น (หากขั้นตอนเดเวลอปปิง ปล่อยให้แถบโปรตีนขึ้นชัดเจน จะทำให้แถบโปรตีนหลังจากขั้นตอนสตอปปิงจะเข้มจนหนาเกินไป เนื่องจากในขั้นตอนสตอปปิงแถบโปรตีนจะเข้มขึ้นได้อีก) จากนั้นนำไปล้างเจลด้วยน้ำปลอดประจุ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (เขย่าเบาๆ) แล้วเทน้ำออก

การเก็บเจล

นำเจลไปถ่ายรูป แล้วแช่ในสารละลายที่มีกลีเซอรอล (87% น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 10 % เขย่าเบาๆ 20 นาที นำเจลไปบรรจุในถุงพลาสติกแล้วผนึกให้เรียบร้อย

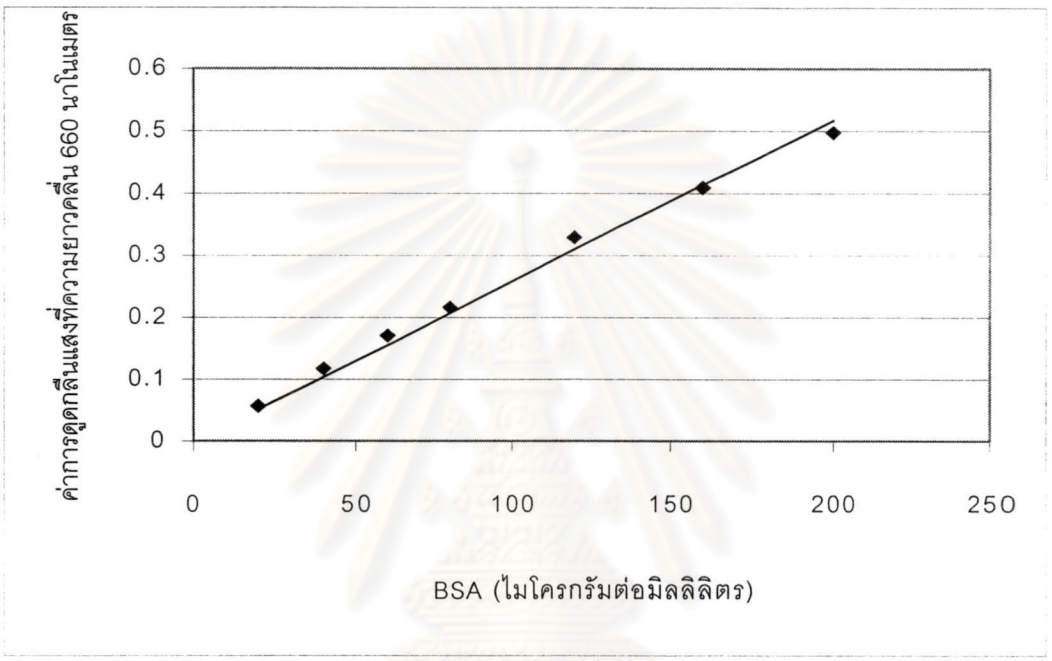
* ควรใส่ถุงมือตลอดการทำงานเนื่องจากป้องกันการปนเปื้อนโปรตีนจากมือ และป้องกันสารที่เป็นพิษ ในการย้อมวิธีนี้ควรใช้น้ำที่ปลอดประจุเสมอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) วิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)



ความชัน = 0.0026

R^2 = 0.9913

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเจษฎา บูรณ์ประเสริฐ เกิดวันที่ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2521 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 363 ถนนเยาวพานิช แขวงสัมพันธวงศ์ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพฯ 10100

ผลงานทางวิชาการที่เข้าร่วมประชุม

เจษฎา บูรณ์ประเสริฐ, ธีรารัตน์ นาประดิษฐ์ และ ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, 2544. การคัดแยกจุลินทรีย์ชอบฝทนร้อนที่สร้างโปรติเอส, หนังสือรวมบทคัดย่อการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. ครั้งที่ 27: หน้า 453

Boonprasert, J., Chaijuckum, P. and Kositanont, C. 2002. Thermostable enzyme producing bacteria isolated from high geothermal sites in Thailand. Poster presented at 7th Biological Science Graduate Congress. 9-11 December, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Abstracts book. p. 53.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย