รายการอ้างอิง

Akrigg, A., and Ayard, S.R. 1970. "Study on the competence-inducing factor of *Bacillus subtilis.*" Biochem. J. 117 : 397-403.

Baldacci, P., Royal, A., Cami, B ., Perrin, F., Krust, A., Gerapin, A., and Kourilky, P. 1979. "Isolation of the lysozyme gene of chicken." Nucleic acid Reaserch. 6: 2667-2681

Boothby, D.L., Danco-Moore, L., Higgins, M.L., Coyette, J., and Shockman, G.D. 1973. "Turnover of bacterial cell wall peptidoglycans." J. Biol Chem. 248: 2161-2169.

Bradford, M.M. 1976 "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing: the printiciple of protein dry binding." Anal. Biochem. 72: 248-254.

Browder, H.P., Zygmunt, W.A., Young, J.R., and Tovormina,P.A. 1965. "Lysostaphin : Enzymatic mode of action." Biochem.Biophys. Res. Commun. 19: 383-389.

Brown,W.C.., Vellom,D., Sclmeph, E., and Greer, C. 1978. FEBS. Letts. 3: 247-249.

_____., and Young, F.E. 1970. "Dynamic interactions between cell wall polymers extracellular proteases and autolytic enzyme." Biochem.Biophys. Res. Commun. 38: 564-568.

Canfield, R.E. 1963. "The amino acid sequence of egg white lysozyme." J. Biol. Chem. 238: 2698-2707.

Carvalho, M.E., Goncalves, M.H., and Silva, M.T., 1987. "Induction of autolysis in *Streptococcus faecium.*" J. Gen. Microbiol. 133: 958-993.

Castenol, L.J., Spevak, W., Adolf, G.R., Chlebowicz-Sledziewska, E., and Pelziewski, A., 1988. "Cloning of humam lysozyme gene and expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.*" Gene. 66: 223-234

Chatterjee, A.N., Wong, W., Young, F.E.,and Gilpin, R.W. 1976. "Isolation and characterization of a mutant of *Staphylococcus aureus* deficient in autolytic activity." J. Bacteriol. 125: 961-967.

Cornett, J.B., and Shockman, G.D. 1978. "Cellular lysis of *Streptococcus faecalis* induced with Triton X-100." J. Bacteriol. 135: 153-160.

Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M. 1986. Data for Biochemical Research. 3rd. Edit. Clarendon press, Oxford.

Dawson, I.M., Lominski, I., and Stern, H. 1953. "An electron microscope study of the action of Cetyltrimetylammonium bromide on *Staphylococcus aureus*." J. Pathol.Bacteriol. 66: 513-526.

Dubos, R.J. 1937. "Machanism of the lysis of *Pneumococci* by freezing and thawing, bile, and other agents." J. Exp. Med. 66: 101-112.

Fein, J.E., 1979. "Possible involvement of bacterial autolytic enzymes in flagellar morphogenesis." J. Bacteriol. 137: 933-946.

_____., and Roger, H.J. 1976. "Autolytic enzyme- defient mutant of *Bacillus subtilis* 168" J. Bacteriol. 127: 1427-1442.

Forsberg, C.W., and Roger, H.J. 1971. "Autolytic enzyme in growth of bacteria." Nature London. 229: 272-273.

_____., and Roger, H.J. 1974. "Characterization of *Bacillus licheniformis* 6346 mutants which have altered lytic enzyme activities." J. Bacteriol. 118: 358-368.

_____., and Ward, J.B. 1972. "*N* - actylmuramyl-L-alanine amidase of *Bacillus licheniformis* and its L-form." J. Bacteriol. 110: 878-888.

_____., Ward, J.B., WyricK, P.D.,and Roger, H.J. 1973. "Effect of phosphate limitation on the morphology and wall composition of *Bacillus licheniformis* and its phosphoglucomutase-defient mutant." J. Bacteriol. 113: 969-984.

Fouche, P.B., Hash, J.H. 1978. "The *N,O*-Diacetylmuramidase of *Chalaropsis* species." J.Biol. Chem. 253: 6787-6793.

Ghuysen, J.M., Tipper,D.J. and Strominger, J.L. 1966. Methods enzymol. 8: 685-699.

Gilby,A.R., and Few,A.V. 1960. "Lysis of protoplast of *Micrococcus lysodeikticus* by ionic detergents." J.Gen. microbiol. 23: 19-26.

Gilpin, R.W., Chattergee, A.N., and Young, F.E. 1972. "Autolysis of microbial cell: Salt activation of autolytic enzyme in a mutant of *Staphylococcus aureus.*" J. Bacteriol. 111: 337-344.

Godson, G.N., and Sinsheimer, R.L. 1967. "Lysis of *Escherichia coli* with a nuetral detergent." Biochim. Biophys. Acta. 149: 476-488.

Guinand, M., Vacheron, M., and Michel, G., 1978. Biochem Biophys Res Commun. 80: 429-434

_____., Vacheron, M.J., Michel, G., and Tipper, D.J. 1979. "Location of peptidoglycan lytic enzyme in *Bacillus sphaericus.*" J. Bacteriol. 138: 126-132.

Herbold, D.R., and Glaser, L. 1975. "*Bacillus subtilis N*-actylmuramic acid L-alanine amidase." J. Biol. Chem. 250: 1676-1682.

Jarretz, E., Gunnison, J.B., Speek, R.C., and Coleman, V.R., 1951. Arch. Intern. Med. 57: 349-359.

Jigami, Y., Muraki, M., Harada, N., and Tanaka, H. 1986. "Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae* : use of synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secreion and processing." Gene. 43: 273-279.

Jolles,P., and Jolles, J. 1984. "What 's new in lysozyme research? : Always a model system, today as yesterday." Molecul. Cell. Biochem. 63: 165-189.

Kingua, S.L., and Ensign, J.C. 1968. "Isolation and characterization of three autolytic enzyme associted with sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *thuringisis.*" J. Bacteriol. 96: 629-638.

Knox and Wicken 1973. "Immunological properties of teichoic acid." Bacteriol. Rev. 37: 215-257.

Koyama, T., Yamada, M., and Matsuhachi, M. 1977. "Formation of regulation packets of *Staphylococcus aureus* cells." J. Bacteriol. 129: 1518- 1523.

Lacks, S. 1970. "Mutant of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and other activities possibly pertinent to genetic transformation." J. Bacteriol. 101: 373-383.

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

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning (A Laboratory Manual) Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Mauck, J., Chan, L., and Glaser, L. 1971. "Turnover of the cell wall of gram-positive bacteria." J. Biol. Chem. 246: 1820-1821.

Miyao, M., and Ozaki, H. 1970. "Clinical results of artificial infant feeding with lysozyme." Final Report. Department of Pediatrics, Tokushima University school of Medicine.

Morita, T., Hara, S., Matsuchima, Y. 1978. J.Biol. Chem. 83: 893-903.

Mosky,P., 1982. "Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: Reexamination of reaction condition." Anal. biochem. 128: 77-85.

Moat A.G., and Foster, J.W. 1979. Microbial physiology 2nd edit. New York J.W. Wally 597 pp.

Muraki, M., Jigami, Y., Tanaka, H., Kishimoto, F., Agui, H., Ogino, S., and Nakasato, S., 1985. "Expression of synthetic human lysozyme gene in *Escherichia coli.*" Agric. Biol. Chem. 49: 2829-2831.

Nakasawa, S., Itagashi, M., Yokota, Y., Otani, Y., Miwa, M., Onitake, M., Nakayama, T., and Fusaoka, N. 1965. "Fundamental studies on the antibiotic properties of a bacteriolytic enzyme, Lysozyme." Final Report. Research Institute of Communicative Disease, Tokyo University. Tokyo, Japan.

Oberto, J., and Davison, J. 1985. "Expression of egg white lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae.*" Gene. 40: 57-65.

Palmiter, R.D. 1972. "Regulation of protein synthesis in chicken oviduct: 1. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomucoid, and lysozyme induction." J. Biol. Chem. 247: 6450-6461.

Pelzer, V.H. 1963. Z.Naturf. 18.b: 950-956.

Poolcy, H.M. 1976a. "Turnover and spreading of old wall during surface growth of *Bacillus subtilis* J. Bacteriol. 125: 1127-1138.

_____. , 1976b. "Layered distribution, According to age within the cell wall of *Bacillus subtilis* J. Bacteriol. 125: 1139-1147.

_____., Shockman, G.D. Higgin, M.L., and Porres-Juan, J. 1972. "Some properties of two autolytic-defective mutants of *Streptococcus faecalis* ATCC 9790." J. Bacteriol. 109: 423-431.

Repaske, R. 1958. "Lysis of gram-negative organism and the role of Versene." Biochim. ET. Biophys. Acta. 30: 225-232.

Roger, H.J., and Forsberg, C.W. 1971. "Role of autolysin in killing of bacteria by some bactericidal antibiotic." J. Bacteriol. 108: 1235-1243.

_____., Perkins, H.R., and Ward, J.B. 1980. Microbial cell wall and membrane. Chapman and Hall Ltd. London. p. 437-459.

_____., Taylor, C., Rayter, S., and Ward, J.B. 1984."Purification and properties of autolytic Endo-B- *N*-acetylglucosaminidase and the *N*- acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Bacillus subtilis* strain 168." J. Gen.Microbiol. 130: 2395-2402.

Rosenthal, R.S., and Shockman, G.D. 1975. "Synthesis of peptidoglycan : In the form of soluble glycan chains by growing protoplasts (autoplasts) of *Streptococcus faecalis.*" J. Bacteriol. 124: 419-423.

_____., Jungkind, D., Danco-Moore, L., Shockman, G.D., 1975. "Evidence for the systhesis of soluble peptidoglycan flagments by protoplast of *Streptococcus faecalis.*" J. Bacteriol. 124: 398-409.

Sayare, M., Danco-Moore, L., and Shockman, G.D., 1972. "Influence of macromolecular biosynthesis on cellular autolysis in *Streptococcus faecalis*." J. Bacteriol. 112: 337-344.

Schleifer, K.H., Kandler, O. 1972. "Peptidoglycan : Types of bacterial cell walls and their taxonomic implication." Bact. Rev. 36: 407- 477 .

Schnaitman, C.A. 1971. "Effect of Ethylendiaminetetraacetic acid , Triton X-100 and Lysozyme on morphology and chemical composition of isolated cell wall of *Escherichia coli* J. Bacteriol. 108: 553-563.

Shafa,F., and Salton, M.R.J. 1960. "Disaggregation of bacterial cell walls by anionic detergents." J.Gen.Microbiol. 22: 137-141.

Shockman,G.D., Pooley, H.M., and Thompson, J.S. 1967. "Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis.* III. Location of autolysin at the site of cell wall synthesis." J.Bacteriol. 94: 1525-1530.

Singer,H.J., Wise, Jr.,E.M., and Park,J.T. 1972. "Properties and purification of *N*-acetyl-muramyl-L-alanine amidase from *Staphylococcus aureus* H." J.Bacteriol. 112: 932-939.

Sippel, A.E., Land, H., Lindermaier, W., Nguyen-Huu, M.C., Wurtz, T., Timmis, K.N., Giesecke K., and Schiitz, G. 1978. "Cloning of chicken lysozyme structural gene sequences synthesized *in vitro*." Nucl. Acids. Res. 11: 1943-1954.

Spizizen, J. 1958. "Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 44: 1072-1078.

Svarachorn, A., Shinmyo, A., Tsuchido, T., and Takano, M. 1989a. "Autolysis of *Bacillus subtilis* induce by monovalent cations." Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 299-304.

_____., Shinmyo, A., Tsuchido, T., and Takano, M. 1989b. "Dependence of autolysis of *Bacillus subtilis* cell on macromolecule synthesis under nutrient limitation." J. Ferment. Bioeng. 68: 252-256.

Thomson, J.S., and Shockman, G. 1968. "A modification of the Park and Johnson reducing sugar. Determination suitable for assay of insoluble materials: Its application to bacterial cell walls." Anal. Biochem. 22: 260-268.

Tilby, M.J. 1978. J. Bacteriol. 136: 10-18.

Tomasz, A., and Waks, S. 1975. "Mechanism of action of penicillin : Triggering of *Pneumococcal* autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis." Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72: 4162-4166.

_____., and Westphal, M. 1971. "Abnormal autolytic enzyme in a *pneumococcus* with altered teichoic acid composition." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 2627-2630.

Tsuchido, T. Svarachorn, A., Soka, H., and Takano, M. 1990. "Lysis and aberrant morphology of *Bacillus subtilis* cells. Cause by surfactants and their relation to autolysin activity." Antimicrob. Agents. Chemother. 34: 781-785.

Wakabayashi, O., Ebihara, M., and Azuma, E. 1970. "Clinical use of lysozyme in field of surgery." Final Report. Department of First Surgery, Itabashi Hospital of Nihon University.

Warth, A.D. 1972. In Spores V, eds. Harverson, H.O., Hanson, R., and Campbell, L.L. Washington. D.C. Am. Soc. Microbiol. pp 28-34

Yoshimura, K., Toibana, A., Kikuchi, K., Kobayashi, M., Hayakawa, T., Nakahama, K., Kikuchi, M., and Ikehara, M. 1987. "Difference between *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* in secretion of human lysozyme." Biochem. Biophys. Res. Commun. 145: 712-718.

Young, F.E., 1966. "Autolytic enzyme associated with cell walls of *Bacillus subtilis.*" J. Biol. Chem. 241: 3462-3467.

_____., and Spizizen, J. 1963. "Biochemical aspects of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system." J.Biol. Chem. 238: 3126-3130.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการเตรียมเอนไซม์ NA-L-alanine amidase (อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Spizizen salt medium ซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีการของ Spizizen, 1955) ประกอบด้วย

1.1 สารละลาย A.

แอมโมเนียมซัลเฟต	2.0	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	4.0	กรัม
โปแตสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต	16.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท	1.0	กรัม
โซเดียมกลูตาเมต	3.0	กรัม
แอล-ทริปโตเฟน	20	มิลลิกรัม

ละลายองค์ประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 900 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สารละลาย B.

กลูโคส	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
วุ้นผง(สำหรับอาหารแข็ง)	20	กรัม

ละลายองค์ประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สารละลาย C.

ละลายแมงกานีสคลอไรด์ 0.5 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เมื่อจะนำมาใช้ผสมสารละลาย A. 900 มิลลิลิตร สารละลาย B. 100 มิลลิลิตร และสารละลาย C. 1 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของแมงกานีสคลอไรด์เป็น 25 ไมโครโมลาร์

การเตรียมอาหารแข็ง ละลายองค์ประกอบทั้งหมดของสารละลาย A. ในน้ำกลั่น ละลายองค์ประกอบทั้งหมดของสารละลาย B. ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายของแต่ละสารละลายให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อและอุณหภูมิของแต่ละสารละลายลดลงเป็นประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย A. ลงในฟาสก์ที่บรรจุสารละลาย B. เติมสารละลาย C. ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 1 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อผสมให้เข้ากัน แต่ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เทลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จานละประมาณ 25 มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ประกอบด้วย

แบคโต-ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
วุ้นผง(สำหรับอาหารแข็ง)	20	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

น้ำยาและสารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสคลอไรด์ pH 8.0 เข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายทริส 121.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายเฟนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลายเฟนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์จำนวน 8.7 กรัม ในไอโซโพรพานอล (isopropanol) 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเฟนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวซ์ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. สารละลายลิเทียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์

ละลายลิเทียมคลอไรด์ 10.59 กรัม ในน้ำกลั่นหรือสารละลายบัฟเฟอร์ทริสคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 (น้ำหนักโมเลกุลของลิเทียมคลอไรด์เท่ากับ 42.39) ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นหรือสารละลายบัฟเฟอร์ทริสคลอไรด์

4. สารละลายโซเดียมเตตราบอเรต (Sodium tetraborate) pH 9.5 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ละลายโซเดียมเตตราบอเรต 3.8137 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 9.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 40,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ละลายไลโซไซม์ 46,200 หน่วยต่อมิลลิกรัม จำนวน 0.009 กรัม ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง (Millipore membrane)

ชนิด HA ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ แบ่งใส่หลอดไมโคร-เซนตริฟิวซ์ ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ตั้งทิ้งไว้ให้หลอมเหลวที่อุณหภูมิห้องและไม่นำส่วนที่เหลือจากการใช้แต่ละครั้งกลับมาแช่แข็งเพื่อนำมาใช้อีก

6. น้ำยาเพื่อการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford)

ละลายสีโครมาสซี่ บริลเลียน บลู จี 250 (Coomassie brilliant blue G 250) 50 มิลลิกรัมในเอธานอลเข้มข้น 95 % จำนวน 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้กรองเอาตะกอนสีออกด้วยกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 3

7. สารละลายเพื่อการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE))

7.1 สารละลายอะคริลาไมด์ ประกอบด้วย

อะคริลาไมด์	72	กรัม
บิส อะคริลาไมด์	2	กรัม

ละลายองค์ประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.2 สารละลายบัฟเฟอร์ เซพาเรตติ้ง เจล (separating gel buffer) ประกอบด้วย

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
ทริส	45.5	กรัม

ละลายทริสในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้มีค่า เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.3 สารละลายบัฟเฟอร์ สแตกกิ้ง เจล (stacking gel buffer) ประกอบด้วย

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
ทริส	15.1	กรัม

ละลายทริสในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.4 สารละลายบัฟเฟอร์แซมเปิ้ล (Sample buffer) ชนิดเข้มข้นสองเท่า (double strength) ประกอบด้วย

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.92	กรัม
เบตา-เมอร์แคบโตเอธานอล	2	กรัม
กลีเซอรอล	4.0	กรัม
ทริส	0.3	กรัม
โบรโมฟีนอล บลู เข้มข้น 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น	2	มิลลิลิตร

ละลายองค์ประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำมาทำให้หลอมเหลวที่อุณหภูมิห้อง ผสมกับสารละลายตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

7.5 สารละลายบัฟเฟอร์ รันนิ่ง เจล (running gel buffer) ประกอบด้วย

ทริส	3	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม

ละลายองค์ประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

7.6 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ในน้ำกลั่นปรับ ปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 มิลลิลิตร ใช้เฉพาะสารละลายที่เตรียมใหม่ๆในแต่ละวันเท่านั้น

7.7 สารละลายฟิกซิ่งและสเตนนิ่ง (fixing and staining solution) ประกอบด้วย

กรดไตรคาร์บอกซิลิกเข้มข้น 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 10 กรัม

สีบริลเลี่ยน บลู อาร์เข้มข้น 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 0.5 กรัม

กรดอะซิติกเข้มข้น 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) 50 มิลลิลิตร

เมธานอลเข้มข้น 50 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) 250 มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบแต่ละส่วนมาผสมให้เข้ากัน ให้เตรียมก่อนใช้ทันที

7.8 สารละลายดีสเตนนิ่ง(destaining solution) ประกอบด้วย

เมธานอลเข้มข้น 5 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) 150 มิลลิลิตร

กรดอะซิติกเข้มข้น 10 %(ปริมาตรต่อปริมาตร) 300 มิลลิลิตร

ผสมเมธานอลและกรดอะซิติกลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 3 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ให้ใช้เฉพาะสารละลายที่เตรียมใหม่ๆในแต่ละวันเท่านั้น

8. สารละลายสำหรับตรวจพิสูจน์ชนิดของเอนไซม์ที่เตรียมได้

8.1 สารละลายฟลูออโรไดไนโตรเบนซีน

ผสมฟลูออโรไดไนโตรเบนซีน 130 ไมโครลิตร ลงไปในเอธานอลเข้มข้น 100 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 10 มิลลิลิตร

8.2 สารละลายคาร์บอเนต-ไซยาไนด์

ผสมโซเดียมคาร์บอเนต 26.5 กรัม และโปแตสเซียมไซยาไนด์ 3.25 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

8.3 สารละลายสี (color reagent) เพื่อการตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ประกอบด้วย

สารละลายที่ 1. สารละลายเฟอริกแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตรของกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

สารละลายที่ 2. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรของกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

สารละลายที่ 3. สารละลายโพลีเอธิลีนไกลคอลเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรของกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

สารละลายที่ 4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

ผสมสารละลายที่ 1: สารละลายที่ 2: สารละลายที่ 3: สารละลายที่ 4 ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของสารละลาย

ผสมนี้ต้องไม่สูงเกินกว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมระหว่างสารละลายที่ 1: สารละลายที่ 2: สารละลายที่ 4 ในอัตราส่วน 1: 1 : 2

ภาคผนวก ค.

1. การเตรียมสารละลายผสมของเซพาเรตติ้ง เจลที่มีความเข้มข้นของเจล 10 % โดยเตรียมในปริมาตร 60 มิลลิลิตรต่อ 1 เจล

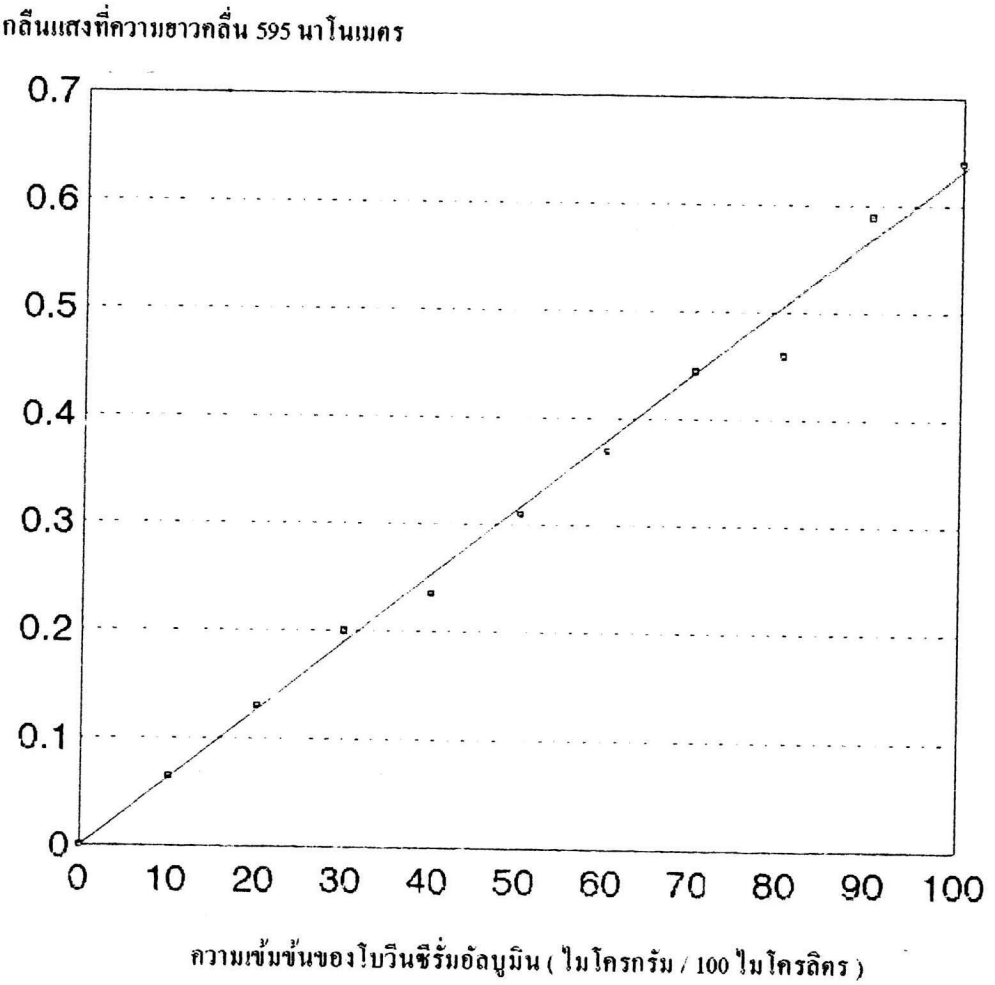
ใช้อะคริลาไมด์เข้มข้น 30 เปอร์เซนต์กับ บิส อะคริลาไมด์เข้มข้น 0.8 เปอร์เซนต์ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโลเวอร์ เจล บัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 19.1 มิลลิลิตร เติม TEMED ลงไป 15 ไมโครลิตร ทำการกำจัดฟองอากาศออกจนหมด จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ลงไป 0.9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเติมลงในแผ่นกระจกที่ใช้เตรียมเจล

2. การเตรียมสารละลายผสมของสแตกกิ้ง เจล

ใช้อะคริลาไมด์เข้มข้น 30 เปอร์เซนต์กับ บิส อะคริลาไมด์เข้มข้น 0.8 เปอร์เซนต์ในปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัพเปอร์ เจล บัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 21.55 มิลลิลิตร เติม TEMED ลงไป 15 ไมโครลิตร ทำการกำจัดฟองอากาศออกจนหมด จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ลงไป 0.45 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมลงบนสารละลายผสมของเซพาเรตติ้ง เจล หลังจากที่เจลดังกล่าวแข็งตัวแล้ว

ภาคผนวก ง.

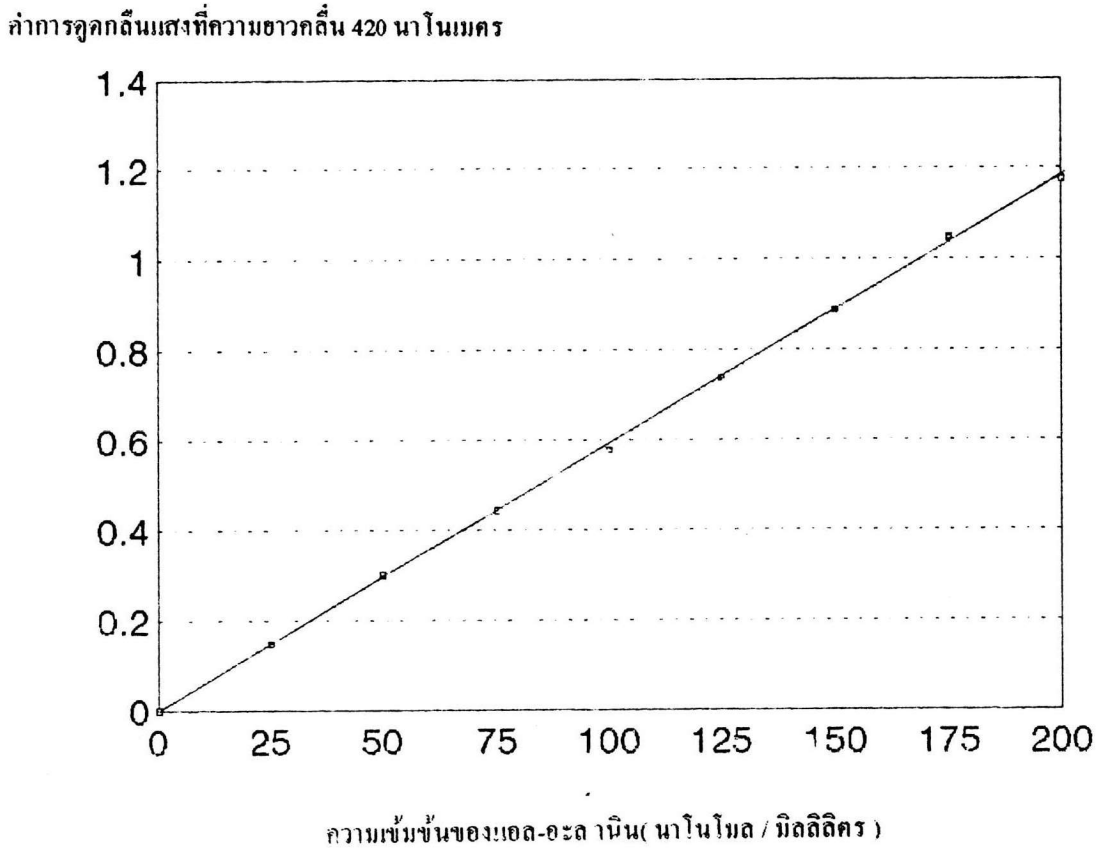
รูปที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของสารละลายโบวีนซีรั่มอัลบูมินในปฏิกริยาตามวิธีของ แบรดฟอรด์ (1976)



แกน X แสดงความเข้มข้นของสารละลายโบวีนซีรั่มอัลบูมินตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรในปฏิกริยา

แกน Y แสดงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

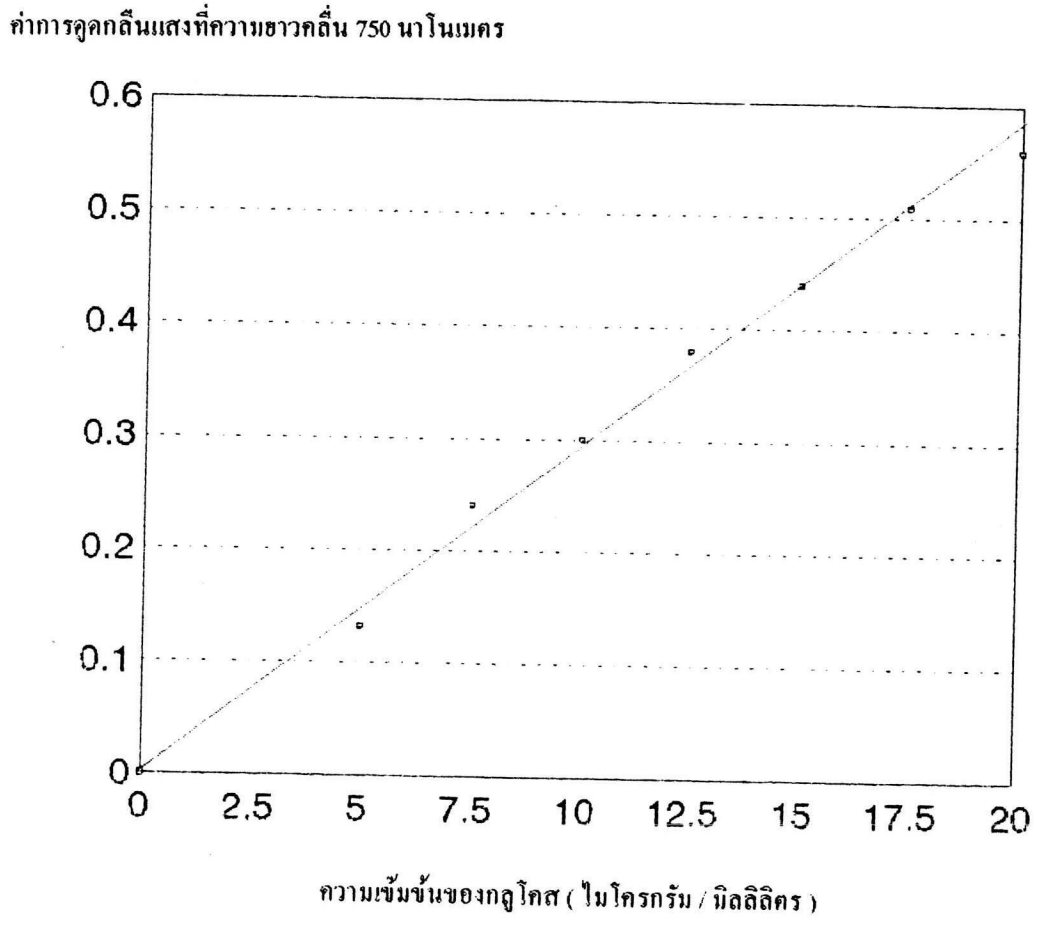
รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของกรดอะมิโนแอล-อะลานินในปฏิกริยาตามวิธีของ Ghuysen *et.al.*, (1966)



แกน X แสดงความเข้มข้นของกรดอะมิโนแอลอะลานินตั้งแต่ 0-200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในปฏิกริยา

แกน Y แสดงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

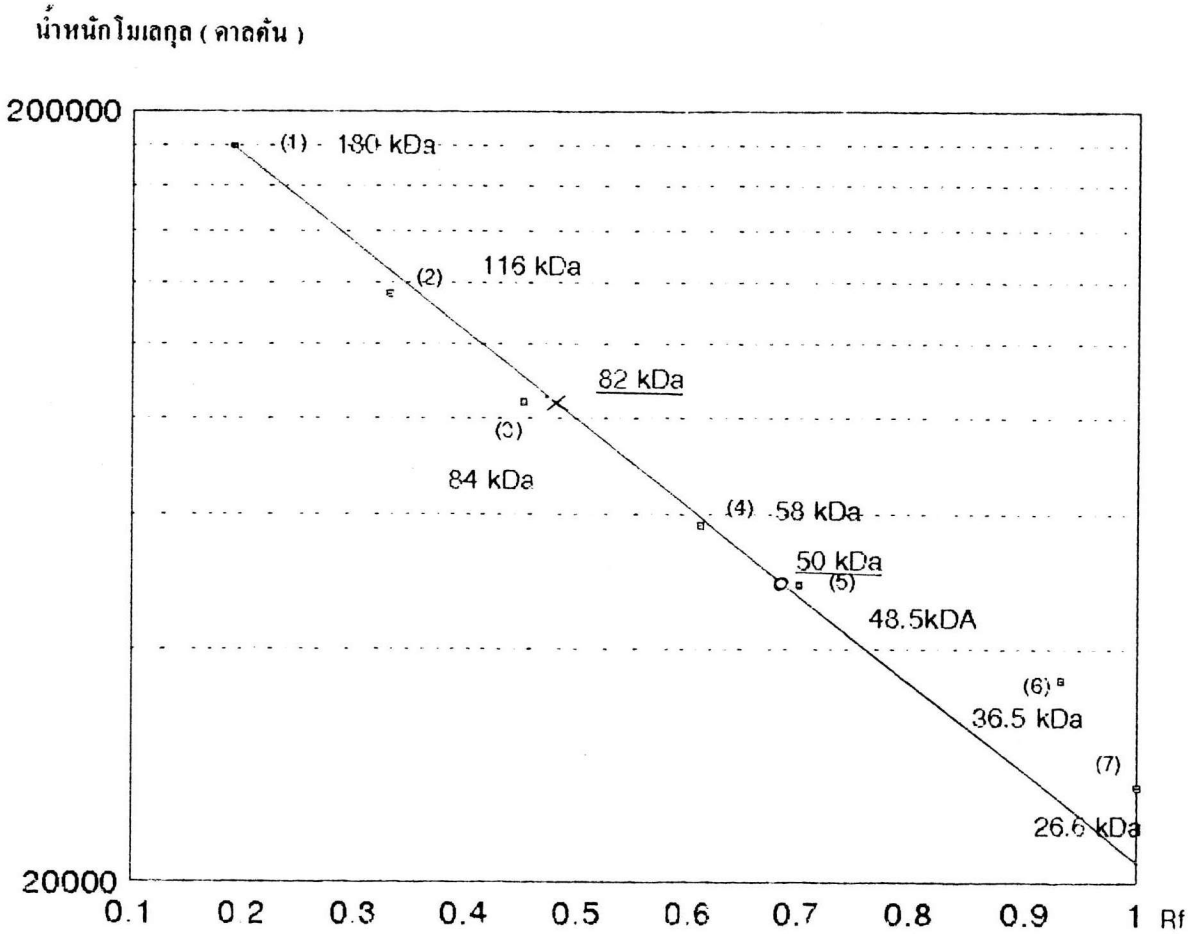
รูปที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในปฏิกริยาตามวิธีของ Thomson และ Shockman (1968)



แกน X แสดงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในปฏิกริยา

แกน Y แสดงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกริยาที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับระยะทางที่แถบโปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่ได้บนเจลโดยวิธี SDS - polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmi, 1970)



แกน X แสดงระยะทางเปรียบเทียบที่โปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่ได้กับระยะทางที่โบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ได้

แกน Y แสดงขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานหน่วยเป็นดาลตัน

ภาคผนวก จ

การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรและจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต (viable cell)

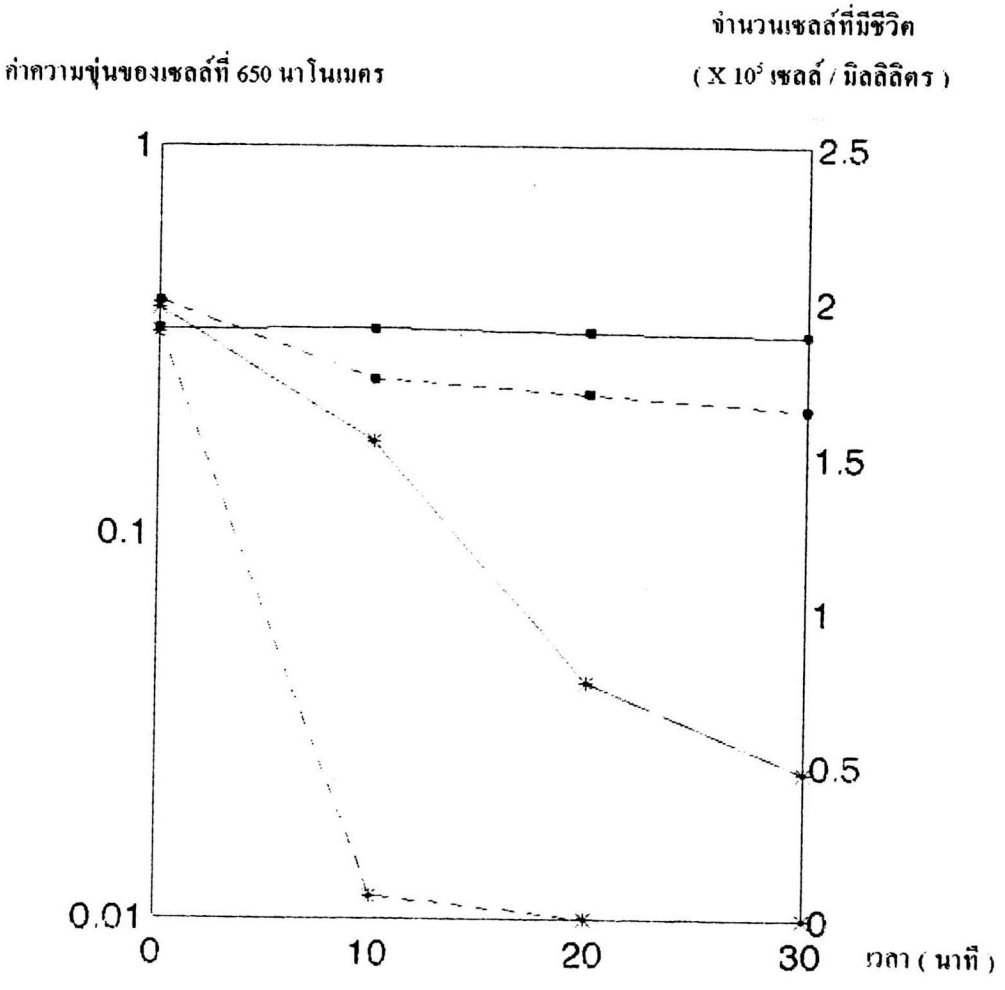
ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการทำให้เซลล์แตก(บทที่ 2 ข้อที่ 4) แต่นำเซลล์แบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายทดสอบที่แต่ละช่วงเวลาหลังจากวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรแล้วมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยนำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำแต่ละความเจือจางจำนวน 200 ไมโครลิตร มาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ โดยวิธีเกลี่ยลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง (วิธี spread plate) ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีเดี่ยวที่ความเจือจางซึ่งได้โคโลนีเดี่ยวอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวนหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตจากสมการ

จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต/มิลลิลิตร = จำนวนโคโลนีที่นับได้ x จำนวนเท่าของความเจือจาง x 0.2

ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

เมื่อนำเซลล์แขวนลอย(cell suspension)ของ *Bacillus subtilis* 168 ที่มีค่าความขุ่นของเซลล์แตกต่างกันมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี spread plate บนผิวหน้าอาหาร LB ชนิดแข็ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 27 จะได้ว่าที่เวลาเริ่มต้นและที่เวลา 20 นาที ค่าความขุ่นของเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ซึ่งมีค่าคงที่คือ 0.337 และ 0.33 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้มีค่าคงที่เช่นเดียวกัน คือ 2×10^5 และ 1.7×10^5 ตาม

ลำดับ ส่วนค่าความขุ่นของเซลล์ในสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์/มิลลิลิตรที่เวลาเริ่มต้นเท่ากับ 0.38 ลดลงเป็น 0.041 ที่เวลา 20 นาทีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้ ก็ลดลงจาก 1.9×10^5 เซลล์ เป็น 0 เซลล์ตามลำดับ แสดงว่าค่าความขุ่นของเซลล์แปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต หรือการลดลงของค่าความขุ่นของเซลล์สามารถใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้ถึงการแตกของเซลล์ได้นั่นเอง



รูปที่ 30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต สัญลักษณ์ที่ใช้ในรูปเป็นดังนี้ คือ ค่าความขุ่นของเซลล์และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 (■), (--■--) ตามลำดับ ค่าความขุ่นของเซลล์และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรของ สารละลายบัฟเฟอร์ทริสเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 (✱),(--✱--) ตามลำดับ

ประวัติผู้เขียน

นายชัชชัย บุญเพ็ชร เกิดเมื่อวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2510 จบการศึกษาระดับปริญญาตรีที่ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เมื่อปีการศึกษา 2533 เข้าศึกษาในคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2534