

## รายการอ้างอิง

- American Public Health Association. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18<sup>th</sup> ed. Washington, D. C. : Water pollution Control Federation.
- Appia-Ayme, C., Guiliani, N., Ratouchniak, J., and Bonnefoy, V. 1999. Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, and aa3-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. Appl. Environ. Microbiol. 65(11): 4781-4787.
- Bacelar-Nicolau, P., and Johnson, D. B. 1999. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. Appl. Environ. Microbiol. 65(2): 585-590.
- Baldi, F., Clark, T., Pollack, S. S., and Olson, G. J. 1992. Leaching of pyrites of various reactivities by *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. 58(6): 1853-1856.
- Bias, U., and Trüper, H. G. 1987. Species specific release of sulfate from adenylyl sulfate by ATP sulfurylase or ADP sulfurylase in the green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* and *Chlorobium vibrioforme*. Arch. Microbiol. 147: 406-410.
- Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E. (eds). 1995. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Bos, P., Boogerd, F. C., and Kuenen, J. G. 1992. Environmental Microbiology (Microbial desulfurization of coal). (n.p): Wiley-Liss.
- Bosecker, K. 1977. Studies on the bacterial leaching of nickel ores. In: Conference Bacterial Leaching (Schwartz, W., Ed.). Verlag Chemie, Weinheim.

- Bosecker, K. 1997. Bioleaching : metal solubilization by microorganisms. FEMS. Microbiol. Lett. 20: 591-604.
- Bowen, T. J., Happold, F. C., and Taylor, B. F. 1966. Studies on adenosine-5'-phosphosulfate reductase from *Thiobacillus denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta. 118: 566-576.
- Brinkhoff, T., and Muyzer, G. 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. Appl. Environ. Microbiol. 63(10): 3789-3796.
- Brock, T. D., and Gustafson, J. 1976. Ferric ion reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 32: 567-571.
- Colmer, A. R., and Hinkle, M. E. 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage; a preliminary report. Science. 106: 253-256.
- Dahl, C. Personal communication.
- Dahl, C. 1996. Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*. Microbiology. 142: 3363-3372.
- Dahl, C., and Trüper, H. G. 1994. Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic bacteria. Methods Enzymol. 243: 400-421.
- Diessel C. F. K. 1992. Coal-bearing depositional Systems. Springer-Verlag.
- Dugan, P. R. 1986. Microbiological desulfurization of coal and its increased monetary value. Biotech.Bioeng. symp. 16: 185-203.
- Ehrlich, H. L. 1990. Geomicrobiology. 2<sup>nd</sup> ed. New York : Marcel Dekker.

- Fakoussa, R. M., and Hofrichter, M. 1999. Biotechnology and microbiology of coal degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 25-40.
- Gómez, F., Amils, R., and Marín, I. 1999. Bioremoval of organic and inorganic sulfur from coal samples. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 118-121.
- Hagen, K. D., and Nelson, D. C. 1997. Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* spp.: enzymology and physiology of marine and freshwater strains in homogeneous and gradient cultures. Appl. Environ. Microbiol. 63(10): 3957-3964.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hipp, W. M., Pott, A. S., Thum-Schmitz, N., Faath, I., Dahl, C., and Trüper, H. G. 1997. Towards the phylogeny of APS reductase and siroheam sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. Microbiology. 143(Pt 9): 2891-2902.
- Hoffmann, M. R., Faust, B. C., Panda, F. A., Koo, H. H., and Tsuchiya, H. M. 1981. Kinetics of the removal of iron pyrite from coal by microbial catalysis. Appl. Environ. Microbiol. 42(2): 259-271.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. F., and Williams, S. T. (eds). 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore : Williams & Wilkins.
- Jensen, A. B., and Webb, C. 1995. Ferrous sulfate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* : a review. Process. Biochem. 30(3): 225-236.
- Kargi, F., and Robinson, J. M. 1982. Removal of sulfur compounds from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*. Appl. Environ. Microbiol. 44(4): 878-883.

- Kargi, F., and Robinson, J. M. 1985. Biological removal of pyritic sulfur from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*. Biotechnol. Bioeng. 27: 41-49.
- Khalid, A. M., Bhatti, T. M., and Umar, M. 1993. An improved solid medium for isolation, enumeration and genetic investigations of autotrophic iron-and sulphur-oxidizing bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 259-263.
- Kirchhoff, J., and Trüper, H. G. 1974. Adenylylsulfate reductase of *Chlorobium limicola*. Arch. Microbiol. 100: 115-120.
- Klein, J., Van A. M., Pfeifer, F., and Schacht, S. 1994. Microbial desulfurization of coal and oil. Fuel Processing Technology. 40: 297-310.
- Kramer, M., and Cypionka, H. 1989. Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate- and sulfite-disproportionating bacteria. Arch. Microbiol. 151: 232-237.
- Kusano, T., Sugawara, K., Inoue, C., Takeshima, T., Numata, M., and Shiratori, T. 1992. Electrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmids containing a *mer* determinant. J. Bacteriol. 174(20): 6617-6623.
- Lacey, D. T., and Lawson, F. 1970. Kinetics of the liquid phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioeng. 12: 29-50.
- Lindström, E. B., Wold, S., Kettaneh-Wold, N., and Sääf, Siv, 1993. Optimization of pyrite bioleaching using *Sulfolobus acidocaldarius*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 702-707.
- Lyric, R. M., and Suzuki, I. 1970. Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. II. Properties of adenosine-5'-phosphosulfate reductase. Can. J. Biochem. 48: 344-354.

- Madgurkar, A. M. 1989. Microbiological desulfurization of coal and coal water admixture to provide a desulfurized fuel. Patent. 4,861,723. USA.
- Markosyan, G. E. 1972. Ein neues eisenoxidierendes Bakterium – *Leptospirillum ferrooxidans* nov. gen. nov. spec. Translated from: Akad. Nauk Armj. SSR Biol. Z. Armen. Bol. 25: 26-29.
- Martin, P. A. W., Dugan, P. R., and Tuovinen, O. H. 1981. Plasmid DNA in acidophilic, chemolithotrophic thiobacilli. Can. J. Microbiol. 27: 850-853.
- Merrettig, U., Wlotzka, P., and Onken, U. 1989. The removal of pyritic sulfur from coal by *Leptospirillum*-like bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31(5-6): 626-628.
- Mishra, A. K., and Pradosh, R. 1979. A note on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium. J. Appl. Bacteriol. 47: 289-292.
- Peck, H. D., Jr., Deacon, T. E., and Davidson, J. T. 1965. Studies on adenosine 5'-phosphosulfate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* and *Thiobacillus thioparus*. Biochim. Biophys. Acta. 96: 429-446.
- Peng, J.-B., Yan, W.-M., and Bao, X.-Z. 1994. Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 176(10): 2892-2897.
- Rai, C., and Reyniers, J. P. 1988. Microbial desulfurization of coals by organisms of the genus *Pseudomonas*. Biotechnology. Progress. 4: 225-230.
- Renosto, F., Martin, R. L., Borrell, J. L., Nelson, D. C., and Segal, I. H. 1991. ATP sulfurylase from trophosome tissue of *Riftia pachyptila* (hydrothermal vent tube worm). Arch. Biochem. Biophys. 290(1): 66-78.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Segal, I. H. Personal communication.
- Shiratori, T., Inoue, C., Numata, M., and Kusano, T. 1991. Characterization and cloning of plasmids from the iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.* 23: 321-326.
- Shiratori, T., Inoue, C., Sugawara, K., Kusano, T., and Kitagawa, Y. 1989. Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171(6): 3458-3464.
- Silverman, M. P., and Lundgren, D. G. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.* 77: 642-647.
- Sperling, D., Kappler, U., Wynn, A., Dahl, C., and Trüper, H. G. 1998. Dissimilatory ATP sulfurylase from the hyperthermophilic sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* belongs to the group of homo-oligomeric ATP sulfurylase. *FEMS. Microbiol. Lett.* 162(2): 257-264.
- Sugio, T., Hirose, T., Zhen, Y. L., and Tano, T. 1992. Purification and some properties of sulfite: ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 174: 4189-4192.
- Sugio, T., Katagiri, T., Moriyama, M., Zhen, Y. L., Inagaki, K., and Tano, T. 1988. Existence of a new type of sulfite oxidase which utilizes ferric ions as an electron acceptor in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(1): 153-157.

- Sugio. T., Mizumashi, W., Inagaki, K., and Tano, T. 1987. Purification and some properties of sulfur: ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*.  
J. Bacteriol. 169: 4916-4922.
- Sugio. T., Mizumashi, W., Inagaki, K., and Tano, T. 1989. Actual substrate for elemental sulfur oxidation of sulfur: ferric ion oxidoreductase purified from *Thiobacillus ferrooxidans*.  
Biochim. Biophys. Acta. 973: 250-256.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., and Case, C. L. 2001. Microbiology an introduction. 7<sup>th</sup> ed.  
(n.p): Addison Wesley Longman.
- Trüper, H. G., and Rogers, L. A. 1971. Purification and properties of adenylyl sulfate reductase from the phototrophic sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*.  
J. Bacteriol. 108(3): 1112-1121.
- Vestal, J. R., and Lundgren, D. G. 1971. The sulfite oxidase of *Thiobacillus ferrooxidans* (*Ferrobacillus ferrooxidans*). Can. J. Bacteriol. 49: 1125-1130.
- Visca, P., Bianchi, E., Polidoro, M., Buonfiglio, V., Valenti, P., and Orsi, N. 1989. A new solid medium for isolating and enumerating *Thiobacillus ferrooxidans*.  
J. Gen. Appl. Microbiol. 35: 71-81.
- Waksman, S. A., and Joffe, I. S. 1992. Micro-organisms concerned with the oxidation of sulphur in soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulphur oxidizing organism isolated from the soil. J. Bacteriol. 7: 239-256.
- Wise, D. L. 1990. Bioprocessing and biotreatment of coal. New York : Marcel Dekker.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSM (*Thiobacillus solid media*) (Visca และคณะ, 1989)

## A : สารละลายเบซอลซอลท์

แอมโมเนียมซัลเฟต	3	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.05	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมไนเตรตเตรไฮเดรต	0.015	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2.5 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 600 มล.ด้วยน้ำกลั่น ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## B : สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต

เฟอร์รัสซัลเฟต	22	กรัม
----------------	----	------

ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 2.5 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 150 มล.ด้วยน้ำกลั่น นำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

## C : สารละลายเจลลิ่ง

เจลแลนแกม	4	กรัม
-----------	---	------

ละลายในน้ำกลั่น 250 มล. ผสมให้เข้ากันประมาณ 10 นาที ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ผสมสารละลาย A และ B ให้เข้ากันที่อุณหภูมิประมาณ 50<sup>o</sup>ซ แล้วจึงเติมสารละลาย C สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 50<sup>o</sup>ซ

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 9K (Khalid และคณะ 1993)

## A : สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต

เฟอร์รัสซัลเฟต	50	กรัม
----------------	----	------

ละลายในน้ำกลั่น 150 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 2.2 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10

นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มล.ด้วยน้ำกลั่น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรอง  
ปลอดเชื้อที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

B : สารละลายเบซอลซอลท์ (Mishra และ Pradosh 1979, Silverman และ Lundgren 1959)

แอมโมเนียมซัลเฟต	3	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมไนเตรตไดไฮเดรต	0.02	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 450 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2.3 ด้วยกรด  
ซัลฟูริกเข้มข้น 10 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มล.ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ  
ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

C : สารละลายเจลลิง

เจลแลนแกม	4	กรัม
-----------	---	------

ละลายในน้ำกลั่น 300 มล. ผสมให้เข้ากันประมาณ 10 นาที หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ  
ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ค่อยๆผสมสารละลาย A และ B ให้เข้ากันที่อุณหภูมิประมาณ 50<sup>o</sup>ซ แล้วจึงเติมสารละลาย C  
สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 50<sup>o</sup>ซ

### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

เบคโต-ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
วุ้นผง (สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง)	15	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 7.5 ด้วยกรด  
ไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่  
อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOB

แบคโต-ทริปโตน	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 950 มล. เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ 10 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ก่อนใช้เติมสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ปลอดเชื้อเข้มข้น 2 โมลาร์ 5 มล.

## 5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2xYT

ทริปโตน	16	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 6. อาหารเลี้ยงเชื้อ 9KS

A: สารละลายเฟอร์ริลซัลเฟต (Vestal และ Lundgren 1971)

เฟอร์ริลซัลเฟตเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 0.8 มล.

ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

B: กำมะถัน (Vestal และ Lundgren 1971)

กำมะถัน (Colloidal sulfur) 5 กรัม

C: สารละลายเบซอลซอลท์ (Mishra และ Pradosh 1979, Silverman และ Lundgren 1959)

แอมโมเนียมซัลเฟต	3	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมไนเตรตไดไฮเดรต	0.02	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 2.3 ด้วยกรด  
ซัลฟูริกเข้มข้น 10 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$   
ความดัน 20 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ผสมสารละลาย A และ B กับสารละลาย C ให้เข้ากันโดยวิธีปราศจากเชื้อ



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

## 1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต (American Public Health Association, 1992)

## 1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ A

แมกนีเซียมคลอไรด์ เพนตะไฮเดรต	30	กรัม
โซเดียมอะซิเตรต ไตรไฮเดรต	5	กรัม
โปแตสเซียมไนเตรต	1	กรัม
กรดอะซิติก	20	มล.

ละลายองค์ประกอบที่ละอย่างในน้ำกลั่น 500 มล. จนเข้ากันทั้งหมด แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

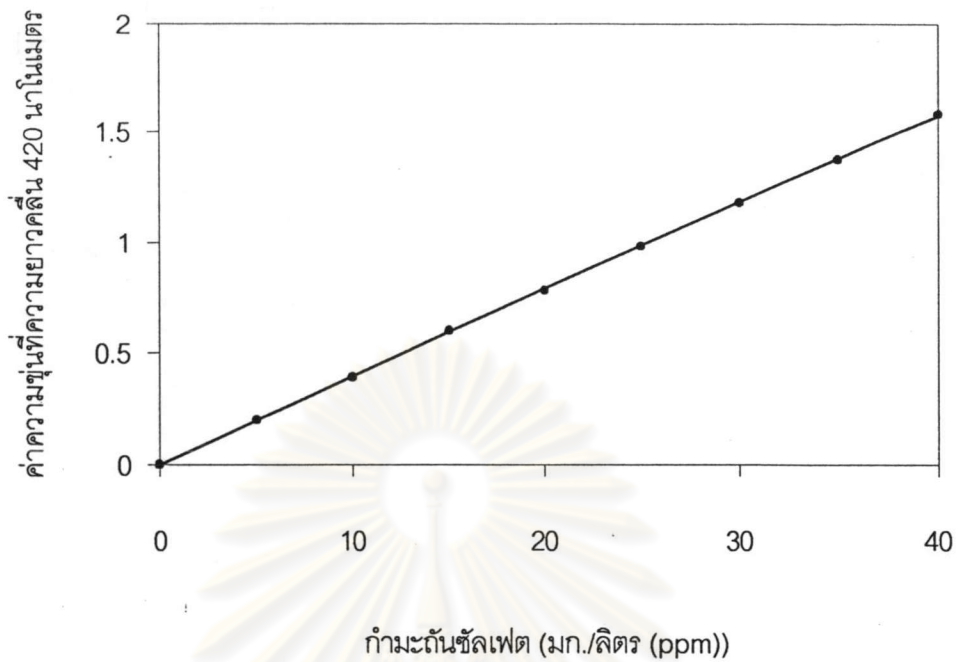
## 1.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมซัลเฟต

ละลายโซเดียมซัลเฟต 0.1479 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของกำมะถันซัลเฟต 0.1 มก./มล. ทำการเจือจางโดยผสมสารละลายมาตรฐานปริมาณ 0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 และ 40.0 มล. ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายกำมะถันซัลเฟตมาตรฐานเข้มข้น 0-40 มก./ลิตร (ppm)

## 1.3 ผลึกแบเรียมคลอไรด์

บดผลึกแบเรียมคลอไรด์ให้ละเอียด นำไปร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 30 เมช (mesh) และในขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต ใช้ผงผลึกแบเรียมคลอไรด์ 0.75 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกัมมะถันซัลเฟต และค่าความเข้มที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

### วิธีวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต

ผสมตัวอย่างในปริมาตรที่เหมาะสมลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น บรรจุตัวอย่างที่เจือจางแล้วในพลาสติกขนาด 250 มล. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ A 20 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมผงแบเรียมคลอไรด์บดละเอียดขนาด 30 เมช 0.75 กรัม เขย่าให้เข้ากันด้วยความแรงเท่าๆกัน ในแต่ละการทดลองเป็นเวลา  $60 \pm 2$  วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที วัดค่าความเข้มของตะกอนแบเรียมซัลเฟตที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

### สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การขจัดกัมมะถันไฟโรต์} = \left( \frac{XV_t}{Vg} \right) \times 0.6242$$

เมื่อ  $X$  = ปริมาณกัมมะถันซัลเฟตที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน ระหว่างค่าความเข้มข้นของกัมมะถันซัลเฟตและค่าความเข้มที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

$V_t$  = ปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด (มล.)

$V$  = ปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมาวิเคราะห์ (มล.)

$g$  = ปริมาณลิแกนด์ที่ใช้ (กรัม)

หมายเหตุ แสดงที่มาของสูตร

จากกราฟมาตรฐาน ค่า  $OD_{420}$  ที่อ่านได้คิดเป็นความเข้มข้นของกำมะถันซัลเฟต =  $X$  มก./ลิตร

นั่นคือ สารละลายที่วิเคราะห์ 100 มล. มีกำมะถันซัลเฟต =  $\frac{X}{1000} \times 100$  มก.

=  $\frac{X}{10}$  มก.

สารละลายที่วิเคราะห์ 100 มล. ได้มาจากการเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อ  $V$  มล. ในน้ำกลั่น

นั่นคือ น้ำเลี้ยงเชื้อ  $V$  มล. มีปริมาณกำมะถันซัลเฟต =  $\frac{X}{10}$  มก.

น้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด  $V_t$  มล. มีกำมะถันซัลเฟต =  $\frac{X V_t}{10 V}$  มก.

น้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด  $V_t$  มล. ได้มาจากการแขวนลอยลิแกนด์  $g$  กรัม ในน้ำกลั่น

นั่นคือ ลิแกนด์  $g$  กรัม ให้กำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อ =  $\frac{X V_t}{10 V}$  มก.

ถ้าลิแกนด์ 1 กรัม จะให้กำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อ =  $\frac{X V_t}{10 V g}$  มก.

หรือได้ กำมะถันซัลเฟตในน้ำเลี้ยงเชื้อ =  $\frac{X V_t}{10 V g}$  มก./กรัมลิแกนด์

ปริมาณกำมะถันในกำมะถันซัลเฟต :

น้ำหนักโมเลกุลของซัลเฟต ( $SO_4^{2-}$ ) 96 มีกำมะถัน (S) เป็นองค์ประกอบ = 32

ดังนั้นกำมะถันซัลเฟต  $\frac{X V_t}{10 V g}$  มก./กรัมลิแกนด์ จะมีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ

$\frac{32}{96} \times \frac{X V_t}{10 V g}$  มก./กรัมลิแกนด์

∴ กำมะถันซัลเฟตที่ได้มาจากกำมะถันซึ่งเป็นองค์ประกอบในกำมะถันไฟไรต์ถูกออกซิไดส์

$$= \frac{32}{96} \times \frac{X V_t}{10Vg} \quad \text{มก./กรัมลิกไนท์}$$

ลิกไนท์ที่นำมาทดสอบมีกำมะถันไฟไรต์ ( $\text{FeS}_2$ ) 10 มก./กรัมลิกไนท์ หรือมีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ ดังนี้ ;

น้ำหนักโมเลกุลของ  $\text{FeS}_2$  119.85 มีกำมะถัน (S) เป็นองค์ประกอบน้ำหนักโมเลกุล =  $32 \times 2 = 64$

$$\text{กำมะถันไฟไรต์ 10 มก. มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ} = \frac{64}{119.85} \times 10 \quad \text{มก.}$$

หรือลิกไนท์ 1 กรัม มีกำมะถันปนเปื้อน = 5.34 มก.

เนื่องจาก กำมะถันซัลเฟตที่วิเคราะห์ได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งได้จากลิกไนท์ 1 กรัม

มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ =  $\frac{32}{96} \times \frac{X V_t}{10Vg}$  มก.

แสดงว่า กำมะถัน 5.34 มก. ในลิกไนท์ 1 กรัม นั้น ถูกออกซิไดส์หรือถูกขจัดออกไป

$$= \frac{32}{96} \times \frac{X V_t}{10Vg} \quad \text{มก.}$$

คิดเป็นร้อยละ

$$= \frac{\left( \frac{32}{96} \times \frac{X V_t}{10Vg} \right)}{5.34} \times 100$$

$$= \left( \frac{X V_t}{Vg} \right) \times 0.6242$$

2. สารละลายแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มก./มล.

แอมพิซิลิน (ในรูปเกลือโซเดียม) 500 มก.

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. แล้วนำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^\circ\text{C}$

3. สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิด

3.1 สารละลาย I

ความเข้มข้นสุดท้าย



สารละลายกลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	5	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	10	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 3.2 สารละลาย II

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 นอร์มอล	0.2	มล.
สารละลายโซเดียมโอดีซิลซัลเฟต เข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	1.0	มล.
น้ำกลั่น	8.8	มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 3.3 สารละลาย III

สารโปแตสเซียมอะซิเตด เข้มข้น 5 โมลาร์	50	มล.
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มล.
น้ำกลั่น	28.5	มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 4. สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม

### A. สารละลายฟีนอล

นำฟีนอลที่ผ่านการทำให้สมดุล (equilibrate) ด้วยทริส-เบส ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 แล้ว มาเติมไฮดรอกซีควิโนลีน (8-Hydroxyquinoline) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

### B. สารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 24:1

ผสมสารละลายฟีนอล และสารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 1:1

5. สารละลายบัฟเฟอร์ TE ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย
- |   |    |             |
|---|----|-------------|
| สารละลายทริส-เบส                        | 10 | มิลลิโมลาร์ |
| สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 | 1  | มิลลิโมลาร์ |
- ผสมองค์ประกอบทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น หนึ่งช่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

6. สารละลายบัฟเฟอร์ TAE (ความเข้มข้น 50 เท่า)

ทริส-เบส	202	กรัม
กรดอะซิติก เข้มข้น	57.1	มล.
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มล.

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

7. สีสติดตาม (tracking dye)

กลีเซอรอล	10	มล.
2- เมอแคปโตเอทานอล	5	มล.
โซเดียมไดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	10	มล.
สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ ค่าความเป็นกรดต่าง 6.8 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	12.5	มล.
สารละลายบรอมฟินอลบลูเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	0.1	มล.

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 12.5 มล.

8. สารละลายสำหรับการเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์

8.1 สารละลาย RF I

โปแตสเซียมอะซิเตต	0.294	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	1.120	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.198	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์	0.990	กรัม
สารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร)	12.19	มล.

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งช่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 8.2 สารละลาย RF II

MOPS	0.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	1.10	กรัม
รูบิเดียมคลอไรด์	0.12	กรัม
สารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร)	12.19	มล.

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 9. สารละลายค่าความเป็นกรดต่างต่ำ ค่าความเป็นกรดต่าง 1.9

แอมโมเนียมซัลเฟต	3	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้นสุดท้าย	0.16	ไมลาร์
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมไนเตรตไดไฮเดรต	0.02	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 1.9 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 10. สารละลายค่าความเป็นกรดต่างสูง ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0

		ความเข้มข้นสุดท้าย
สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	25	มิลลิไมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	10	มิลลิไมลาร์
สารละลายน้ำตาลซูโครส	0.3	ไมลาร์

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 11. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตรพอเรชัน ค่าความเป็นกรดต่าง 6.4

		ความเข้มข้นสุดท้าย
PIPES	3	มิลลิไมลาร์
สารละลายน้ำตาลซูโครส	272	มิลลิไมลาร์

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 6.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้ในที่มืด

## 12. สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์

12.1 สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ เข้มข้น 0.02 มก./มล.

เมอคิวริกคลอไรด์ 0.0002 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

12.2 สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ เข้มข้น 0.25 มก./มล.

เมอคิวริกคลอไรด์ 0.0025 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

12.3 สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ เข้มข้น 0.075 มก./มล.

เมอคิวริกคลอไรด์ 0.0075 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 13. สารละลายเบซอลซอลท์ ค่าความเป็นกรดต่าง 1.9

แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม

โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม

แคลเซียมไนเตรตไดไฮเดรต 0.02 กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 1.9 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 14. สารละลายบัฟเฟอร์ซีท ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0

	ความเข้มข้นสุดท้าย
สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-คลอไรด์ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	50 มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	2 มิลลิโมลาร์
น้ำตาลซูโครส	25% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 110<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 15. สารละลายโซเดียมโคเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

โซเดียมโคเดซิลซัลเฟต	10 กรัม
----------------------	---------

ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. อุณหภูมิ 68<sup>o</sup>ซ เพื่อช่วยการละลาย ปรับค่าความเป็นกรดต่าง เป็น 7.2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น

## 16. สารละลายโปรตีนเนสเค เข้มข้น 20 มก./มล.

โปรตีนเนสเค	20 มก.
-------------	--------

ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มล.

## 17. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์	14.61 กรัม
----------------	------------

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 18. สารละลายทริส-คลอไรด์ ค่าความเป็นกรด-ต่าง 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ทริส-เบส	12.11 กรัม
----------	------------

ละลายในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตาราง นิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 19. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

19.1 สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ควรเก็บไว้ในที่มืด)

## 19.1.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต	20	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	4	กรัม
โพแทสเซียม โซเดียม(+)-ทาร์เทรต	0.2	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปริมาณสุดท้ายเป็น 1,000 มล. ด้วย

น้ำกลั่น

## 19.1.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คิวบิควิลเฟต	2.5	กรัม
--------------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่น 500 มล.

## 19.1.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

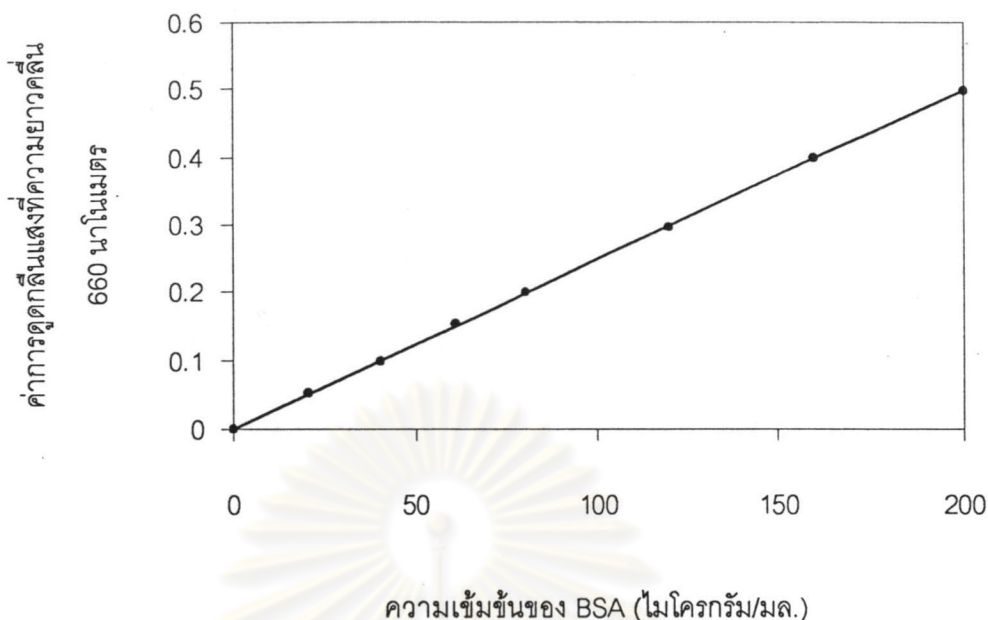
Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

## 19.1.4 สารละลาย Lowry D (phenol reagent) ประกอบด้วย

สารละลายโฟลีน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin-phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

## 19.2 สารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

ละลาย BSA 2 มก. ในน้ำกลั่น ปริมาณสุดท้ายเป็น 10 มล. ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของ BSA 0.2 มก./มล. ทำการเจือจางโดยผสมสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มล. ในน้ำกลั่น ปริมาณสุดท้ายเป็น 1 มล. ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มล.



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin (BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

### วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ผสมสารละลาย Lowry C 5 มล. กับสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 1 มล. ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Lowry D 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

#### 20. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟอสโฟริเลส

##### 20.1 สารเคมีที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟอสโฟริเลส

20.1.1 สารละลายทริส-คลอไรด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 (Tris-Cl pH 8.0) เข้มข้น 1 โมลาร์

ทริส-เบส	121.1	กรัม
----------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

20.1.2 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

แมกนีเซียมคลอไรด์	0.4066	กรัม
-------------------	--------	------

ละลายในน้ำกลั่น 20 มล.

20.1.3 สารละลายเบตา-ดี(+)-กลูโคส ( $\beta$ -D(+)-glucose) เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์

เบตา-ดี(+)-กลูโคส	0.7208	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น 20 มล.		

20.1.4 สารละลายนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NADP) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

NADP	20	มก.
ละลายในน้ำกลั่น 5 มล.		

20.1.5 สารละลายอะดีนีน - 5' - ฟอสโฟซัลเฟต (APS) เข้มข้น 1.33 มิลลิโมลาร์

APS	2.85	มก.
ละลายในน้ำกลั่น 5 มล.		

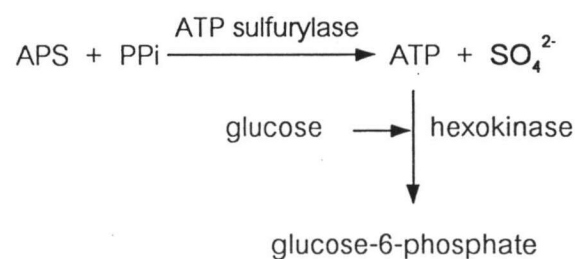
20.1.6 สารละลายโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Sodium pyrophosphate) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

โซเดียมไพโรฟอสเฟต	0.8922	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น 20 มล.		

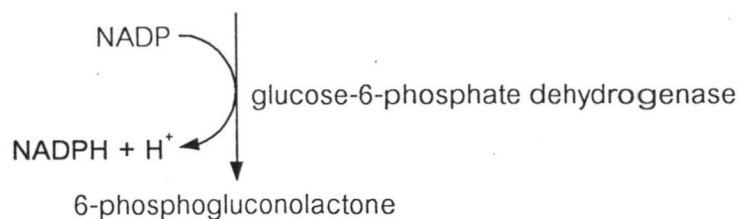
20.2 วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟอสโฟไรเลส (Dahl และ Trüper 1994)

### หลักการ

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย APS, PPi, ATP sulfurylase, glucose, hexokinase, NADP และ glucose-6-phosphate dehydrogenase APS จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นซัลเฟต และ ATP โดย ATP sulfurylase จากนั้น ATP ที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสร้าง glucose-6-phosphate จาก glucose โดย hexokinase ต่อจากนั้น glucose-6-phosphate จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 6-phosphogluconolactone โดย glucose-6-phosphate dehydrogenase และ NADP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น NADPH ดังวิธีที่แสดง







หากิจกรรมของเอนทิพีซัลฟูรีเลสจากปริมาณ NADPH ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ มีค่าเท่ากับ ปริมาณ ATP sulfurylase ที่ทำให้เกิด NADPH หรือซัลเฟต 1 ไมโครโมลต่อนาที

ตารางที่ ข.1 สารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนทิพีซัลฟูรีเลส

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิโมลาร์)
1. Tris-Cl pH 8.0	1,000	300	100
2. MgCl <sub>2</sub>	100	120	4
3. β-D(+) glucose	200	300	20
4. NADP	5	300	0.5
5. APS	1.33	450	0.2
6. glucose-6-phosphate dehydrogenase	1153.2 หน่วย/มล.	26.04	10 หน่วย/มล.
7. hexokinase	995.5 หน่วย/มล.	22.5	7.5 หน่วย/มล.
8. crude extract (ATP sulfurylase)	-	970	-
9. Sodium pyrophosphate (เติมทีหลัง)	100	30	1
10. น้ำกลั่น	-	481.46	-
ปริมาตรรวม	-	3,000	-

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดยกเว้นโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Sodium pyrophosphate) ในหลอดทดลอง แล้วย้ายมาใส่ในคิวเวตต์ นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เป็นเวลา 2 นาที เพื่อใช้ในการทดลองชุดควบคุมคือไม่มีกิจกรรมของเอนทิพีซัลฟูรีเลส จากนั้นจึงเติมโซเดียมไพโรฟอสเฟต

ผสมให้เข้ากันโดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรอีกครั้ง คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ซัลฟูไรเลสจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

หมายเหตุ - กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับปริมาณ ATP sulfurylase ที่ทำให้เกิด NADPH 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

- ใช้คิวเวตต์ที่มีระยะห่างของช่องให้แสงผ่าน (path length) 1 ซม.

สูตรที่ใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของ NADPH

$$C = \frac{\Delta A \times \text{dilution}}{\epsilon l}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของ NADPH (ไมโครโมล x นาที<sup>-1</sup> x มล.<sup>-1</sup>)

$\Delta A$  = ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร  
ในเวลา 1 นาที

dilution = ค่าการเจือจางของ crude extract ที่ใช้ในส่วนผสมของปฏิกิริยา

$\epsilon$  = extinction coefficient (กำหนดให้เท่ากับ 6.22 ไมโครโมล<sup>-1</sup> x ซม.<sup>-1</sup> x มล.)

l = ระยะห่างของช่องให้แสงผ่านของคิวเวตต์ (path length) (ซม.)

ค่าที่ได้จากการทดลอง;  $\Delta A/\text{นาที} = 1.53 - 1.274 = 0.256$  dilution = 1.5 l = 1 ซม.

แทนค่าในสูตร;  $C = \frac{0.256 \times 1.5}{6.22 \times 1} = 0.062$  ไมโครโมล x นาที<sup>-1</sup> x มล.<sup>-1</sup>

จะได้ความเข้มข้นของ NADPH = 0.062 ไมโครโมล x นาที<sup>-1</sup> x มล.<sup>-1</sup>

ดังนั้น ความเข้มข้นของเอนไซม์ = 0.062 หน่วย/มล.

สูตรที่ใช้ในการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{Act.} = \frac{C_{\text{enz.}} \times V_T \times 1}{V_E}$$

เมื่อ Act. = กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วย/มล. ของ crude extract)

$C_{\text{enz.}}$  = ความเข้มข้นของเอนไซม์ (หน่วย/มล.)

$V_T$  = ปริมาตรรวมของส่วนผสมของปฏิกิริยา (มล.)

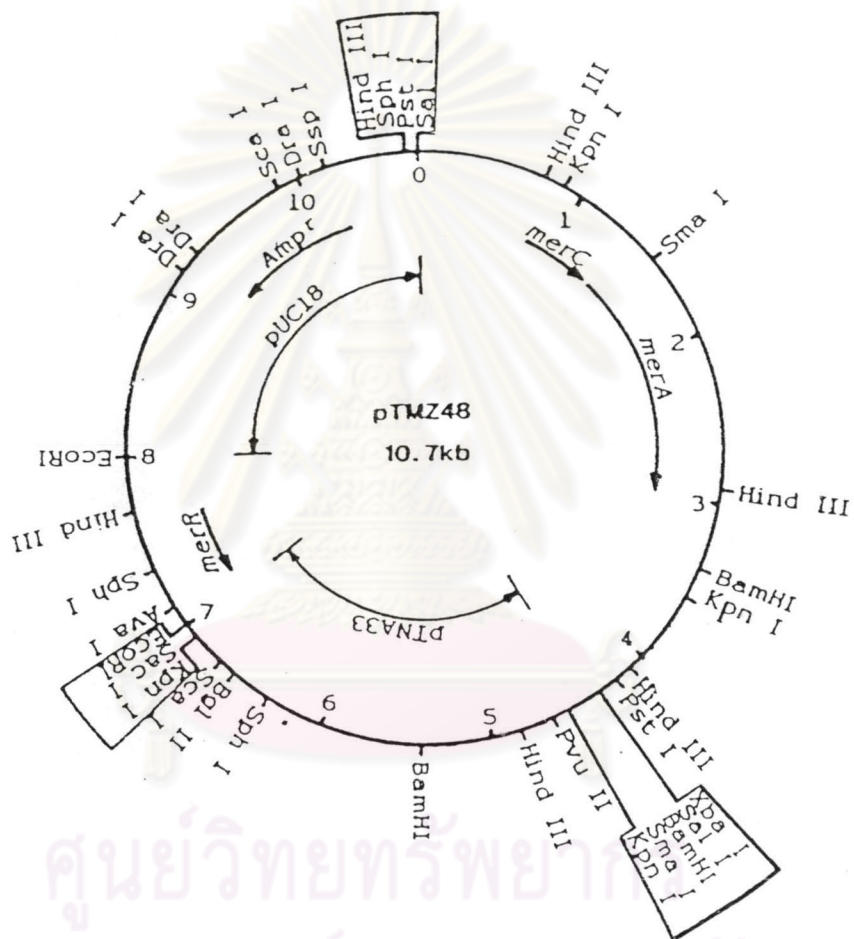
$V_E$  = ปริมาตรของ crude extract ที่ใช้วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ (มล.)

ค่าที่ได้จากการทดลอง;  $C_{\text{enz.}} = 0.062$  หน่วย/มล.  $V_T = 3$  มล.  $V_E = 0.97$  มล.

แทนค่าในสูตร;  $\text{Act.} = \frac{0.062 \times 3}{0.97} = 0.192$  หน่วย/มล. ของ crude extract

ดังนั้น กิจกรรมของเอนไซม์ = 0.192 หน่วย/มล. ของ crude extract

ภาคผนวก ค

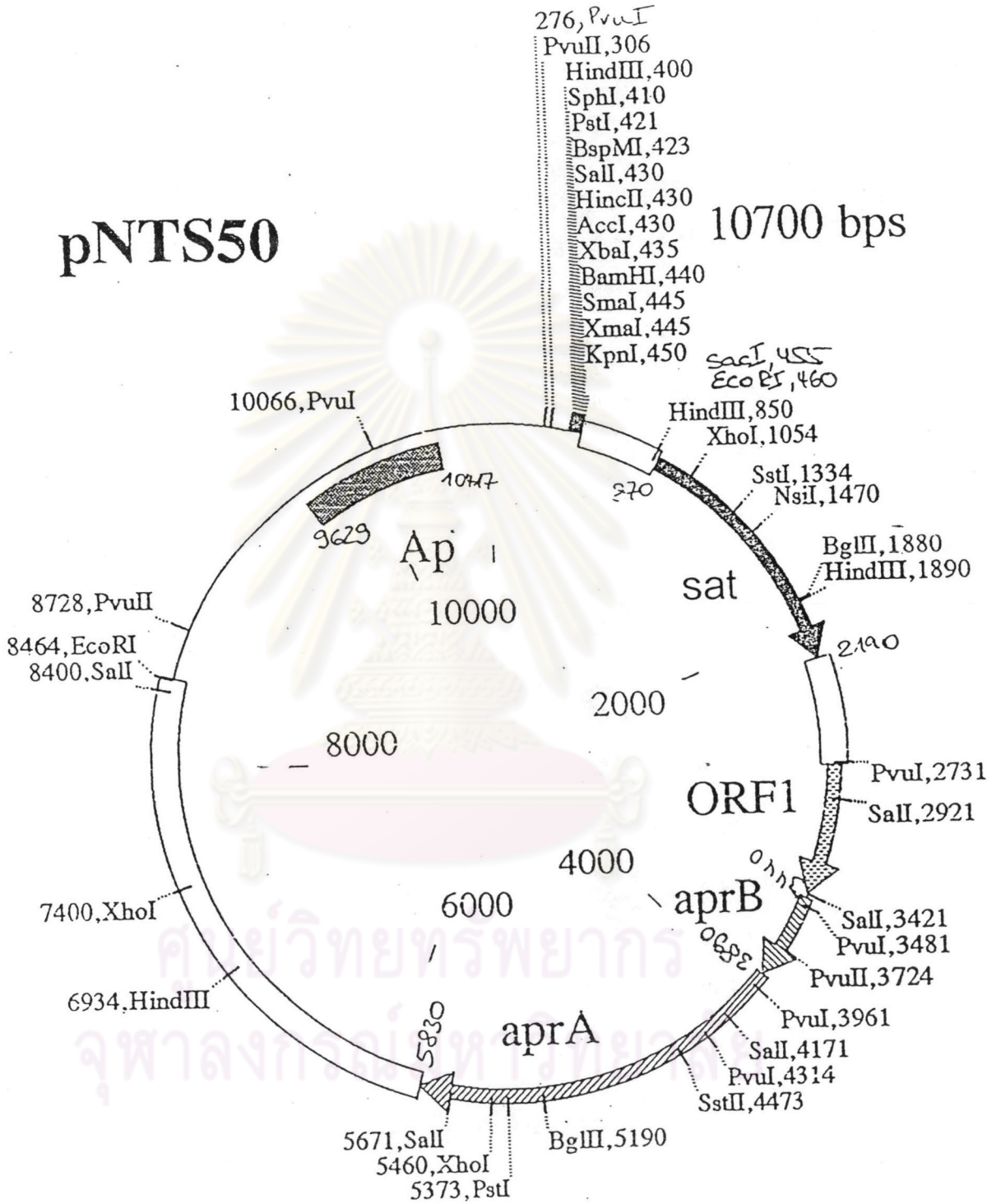


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ ค.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pTMZ48

# pNTS50

10700 bps



ภาพที่ ค.2 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pNTS50

ยีน *sat* มีบริเวณถอดรหัสที่ตำแหน่ง 121-1,326 เบส หรือเท่ากับ 1,206 เบส (มีตำแหน่งครอบคลุมจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีนที่บริเวณ 133-1,326 เบส)

1 aagctttcac aaaaccgag cttttctgct attttcccc accaaacggc gatcgcctcg  
61 ctcaggctac gaactcaggc ggatgcaacg catccagtgg cgtcttcacc ctctgtcgaa  
121 ggaggttcgt g**cat**gatcaa gccagtcggc tctgatgaac tcaggccgcg tttcgtctat  
181 gaccccgagc agcaccaccg actctcgagc gaagccgagt cgctgccctc ggtgatcgtc  
241 agctcccagg cggccggcaa tgccgtcatg ctgggcgccg ggtatttcag cccgctcgac  
301 gggttcatga atctggccga cgcgctcagt agcgcgcagt cgatgactct gaccgacggg  
361 cgcttcttcc cggtgccgct gctctgtctg ctggaatcgg ccgacgccat cgccggcgcc  
421 acgcgaatcg cactgctgta cccgaacgtc gagggcaatc cggactggc ggtcatggat  
481 gtcaccgccg tcgaacaggt ctcgacgcg cagatggccc tgatgaccga acaggtctac  
541 ggcacctcgg acccgaagca cccaggcgtc gagacctca acagccaggg cgcacagcc  
601 sat1  
601 -atctcgggac cgatccagg tctcaacttc tcctacttcc agaccgactt ccccgacacc  
661 ttccgcaccg ccgtcgagat ccgccacgag atccaggagc gcggctggca gaagatcgtc  
721 gccttcaga cccgcaacc catgcatcgc gcgcacgagg aactgtgcaa gatggcgatg  
781 gaggcggtcg aggccgatgg cgtcgtgatc cacatgctgc tcggtcagct caagccgggc  
841 gacatcccgg ccccggtgcy cgatgcggcc atccgcacca tggccgagct ctatttcccg  
901 cccaataccg tgatggtcac gggctacggc tttgacatgc tctatgccg accgcygag  
961 gcggtgctgc acgcctattt ccgtcagaac atgggcygca cccacttcat catcgggcy  
1021 gatcatgccg gcgtcggcga ttactacggt ccctcgcag cccagaccat cttcgatgac  
1081 sat2  
1081 gcggttccga ccgacgtgct cgctatcgag atcttccgcy ccgacaacac ggcctactcc  
1141 aagaagcttg gacgagtcgt gatgatcgc gacgcccc accatacacc ggatgacttt  
1201 atccagttgt ccggtactcy ggtgcgcgag atgctcggcc agggcgaggc cccgcccc  
1261 gagttctcgc gtcccagggt cgcccagatc ctcatggatt actaccggtc actccctcag  
1321 tcg**tag**ccca acggagagcc agtcaactac cccgccaga agggcgaggc ttgtgtagag  
1381 caagctgagt tgaccagcct aagcccgcct gaccaggagg gtcgaaagga ctacgtgtgc  
1441 aacaggtcgt taagactcac cggcgatgc ttcctcagtc cgccgctctg aaaggtcagg  
1501 atcaggctga cgaaaggtaa agcgtcgaag gtcttgatcy ccgtgcaagc aggagccggt  
1561 tgccacatt ggcgagggga gcgaccagcy cgcgagggtc gtccgtcacc aggccttac  
1621 gggcagagcc tcgcyggccc gcaggtggaa agcctgcacc tgtttccggc ggctgaactg

1681 tcgtagccgc tatccctccc cgcccttaag gacgggggtt ctgc

ยีน *apr* มีบริเวณถอดรหัสที่ตำแหน่ง 1,726-4,952 เบส หรือเท่ากับ 3,227 เบส (มีตำแหน่งครอบคลุมจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีนที่บริเวณ 1,742-4,952 เบส)

1726 ggagg aactgattga

1741 **gatg**attacc agcaatccct tcatcgaact atcggcgggtt attccgccgg gcgtgatgca

1801 ggcctatgtc gtggtgatga tccttctggt catcggcggc accctgctcg acgtcaagca

1861 caagaagagc gccagatt tcttcgagaa aggcaagtcg ctcaagaaac tggccaagcg

1921 cgaagtcggc ggcgccgaga agatcggctt ggccgtcagc accctggcca acgaagttct

1981 ggcctcgggc gagttcgaga atcccgatcg gcgcaagtcc cacctgctca tgatgatgg

2041 cttcgtcacc ttcgtggtga cgaccgcgat cctgatcttc ggctggaag gggagacctc

2101 gggtttcgtg tccctgctct ggcacctcgg cgcactgatg gtctgcatcg gcggctactg

2161 gttctgggtc aagatccgcg tcgacgtgcg ctccgagggc cacgcctggc atgacgtgca

2221 tctgtcggat ctgttcatcg tctcgtgct cttgacgacg accctggccc tgggtggtc

2281 gctgctggat tcgatgctca tcttcgctt cttcatcgcc gccgccacca cgctgttcgg

2341 caccgtctac tggtcgaagc tggcgcacat gttcttcaag cccgccgctg ccttccagaa

2401 gaaggtcgcc aaggccgacg gctcgtcga caagctgccc gagatgccc agctgaccga

2461 tcccatcgtc aaagagcgt atccggacat cccgacctac atgggcgaaa cccgcacct

2521 catgggcctg gggatcaagc gcgaagcgc gaccattac **tgat**ctcacc gcgctgaaca

2581 cagtcgagag agaagaggat cacgaga**atg** ccaacgttcg tctatatgac gcgctgcgac

2641 ggttgcgcc aatgcgtcga catctgccc tcggacatca tgacatcga cacgaccatc

2701 cgtcgtgcct acaacatcga acccaacatg tgctgggagt gctactcctg cgtcaaggcc

2761 tgtccgaca acgcatcga cgtgcggt tatgccgact tcgccccgt gggctcactcg

2821 gtgcgggtgc gtcgacga ggagaagggc gtcacgcct ggccatcat cttccgcaac

2881 ggcgagaagg acatgaacct gtcgcccc atcaccacca agccctgggg gcagtgcacg

2941 cccaagctca aggaggtgcc ggcgccgtcg aacgagatgc gcgacagcca gctgctgttc

3001 aacgagccca agtacattcg tctcgatgac ggcggctctgc atacgtgga gtccaacggc  
apr1

3061 ctgaaaatgc aagcaggggt gtgctactga **tggt**tacaa gacaatcatc gaggacggca

3121 tcgacgttct ggtcgtcggc gcgggcctgg gcggcacggg cgcggccttc gaggcgcgct

3181 actgggttca ggacaagaag atcgtcatcg ccgagaaggc caacatcgat cgctccggtg



- ภาพที่ ค.3 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 4 สาย บนลำดับเบสของยีน *sat* และยีน *apr*
- ATG start codon หมายถึง จุดเริ่มต้นของการแปลรหัสโปรตีน
  - TAG และ TGA stop codon หมายถึง จุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีน

#### ข้อมูลลำดับเบสของยีน *sat*

- มีตำแหน่ง -35 signal ที่บริเวณ 6-11 เบส
- มีตำแหน่ง -10 signal ที่บริเวณ 30-35 เบส
- มีตำแหน่งสำหรับไรโบโซมเกาะ (ribosome binding site) ที่บริเวณ 121-125 เบส
- มีบริเวณถอดรหัสที่ตำแหน่ง 121-1,326 เบส (หรือเท่ากับ 1,206 เบส)
- มีตำแหน่งจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีนที่บริเวณ 133-1,326 เบส

#### ข้อมูลลำดับเบสของยีน *apr* ประกอบด้วยยีน *aprM*, *aprB* และ *aprA*

##### 1. ยีน *aprM*

- มีตำแหน่งสำหรับไรโบโซมเกาะ (ribosome binding site) ที่บริเวณ 1,726-1,730 เบส
- มีบริเวณถอดรหัสที่ตำแหน่ง 1,726-2,563 เบส (หรือเท่ากับ 838 เบส)
- มีตำแหน่งจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีนที่บริเวณ 1,742-2,563 เบส

##### 2. ยีน *aprB*

- มีตำแหน่งสำหรับไรโบโซมเกาะ (ribosome binding site) ที่บริเวณ 2,594-2,598 เบส
- มีบริเวณถอดรหัสที่ตำแหน่ง 2,594-3,090 เบส (หรือเท่ากับ 497 เบส)
- มีตำแหน่งจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีนที่บริเวณ 2,608-3,090 เบส

##### 3. ยีน *aprA*

- มีตำแหน่งสำหรับไรโบโซมเกาะ (ribosome binding site) ที่บริเวณ 3,072-3,075 เบส
- มีบริเวณถอดรหัสที่ตำแหน่ง 3,072-4,952 เบส (หรือเท่ากับ 1,881 เบส)
- มีตำแหน่งจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีนที่บริเวณ 3,090-4,592 เบส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนาตยา รวมทรัพย์ เกิดวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ.2519 จ.ปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ในปีการศึกษา 2541

ผลงานทางวิชาการที่เข้าร่วมประชุม :

Ruamsap, N., Akaracharanya, A. 2000. Optimization of bioleaching process for pyritic sulfur removal from lignite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Poster presented at the 12<sup>th</sup> Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology. 1-3 November, Felix hotel, Kanchanaburi, Thailand.

นาตยา รวมทรัพย์ และ อัญชริดา อัครจรัสญา. 2545. การหาภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไบโโอลิชซิงเพื่อการขจัดกำมะถันในรูปไพไรต์จากลิกไนต์โดย *Thiobacillus ferrooxidans*. การเสนอผลงานแบบบรรยายในการประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 10. 20-22 พฤศจิกายน, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย