

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. PDA (Potato Dextrose Agar)

Potato	250 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Agar	20 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร $\text{pH} = 6.0$ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Fukumoto

Dextran T 2000 (2%)	20 กรัม
0.3% NaNO_3	2 กรัม
KH_2PO_4	2 กรัม
Yeast extract (0.1%)	1 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 กรัม
KCl	0.5 กรัม
FeSO_4	0.01 กรัม
Agar	20 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร $\text{pH} = 6.5$ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

1. เตรียมสารละลายกลูโคส 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคส (stock)ที่มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ดังตาราง
2. เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$
3. เติม Alkaline Copper Reagent 0.5ml ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็น
4. เติม Nelson Reagent 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 5 ml
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm

ตาราง แสดงการเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0 – 200 $\mu\text{g/ml}$

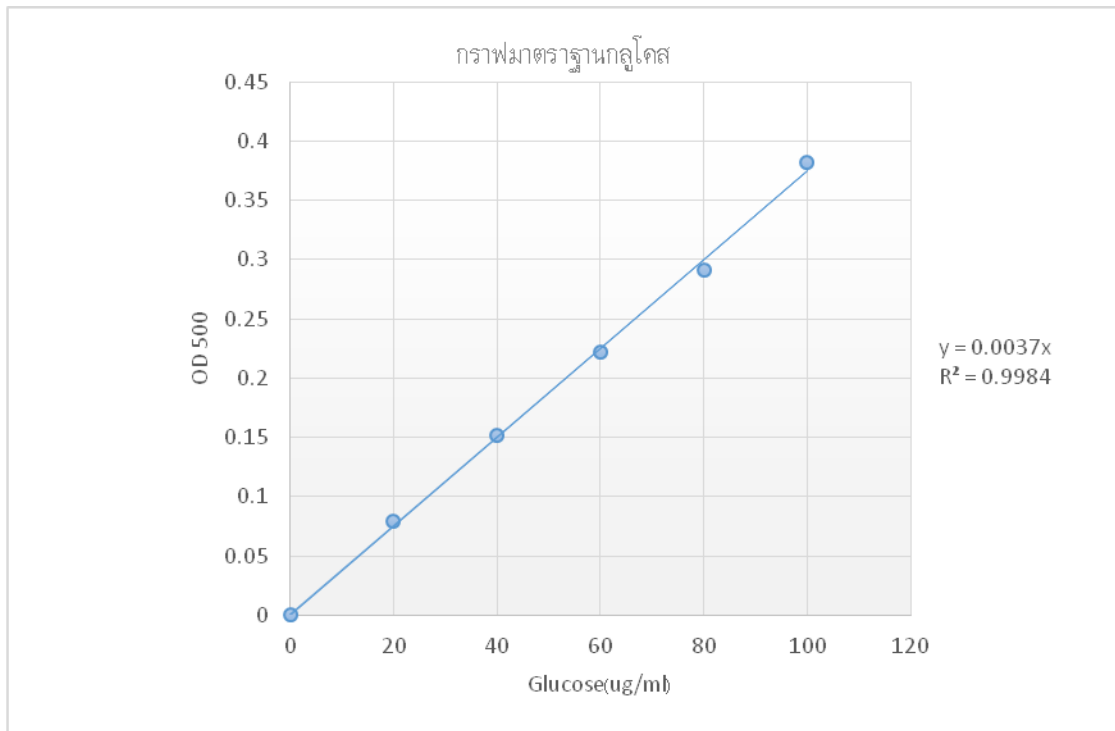
หลอดที่	ความเข้มข้นของ สารละลายกลูโคส ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาตรที่นำมาจาก stock (ml)	ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม (ml)
1	0	0	1.0
2	20	0.1	0.9
3	40	0.2	0.8
4	60	0.3	0.7
5	80	0.4	0.6
6	100	0.5	0.5

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

กิจกรรมเอนไซม์ dextranase คือ 1 Unit = ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 μmol of reducing sugar/ นาที ที่ 40°C

สูตรการคำนวณ

$$\text{Enzyme activity} = \text{OD (ที่แท้จริง)} / \text{Slope Slope (จากกราฟมาตรฐานกลูโคส)} \times \text{Dilution factor} \times 1 \mu\text{mol of Glucose} / \text{ml} / \text{min}$$



รูปแสดง กราฟมาตรฐานกลูโคส

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (โดยวิธี Lowry's method)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Lowry's reagent

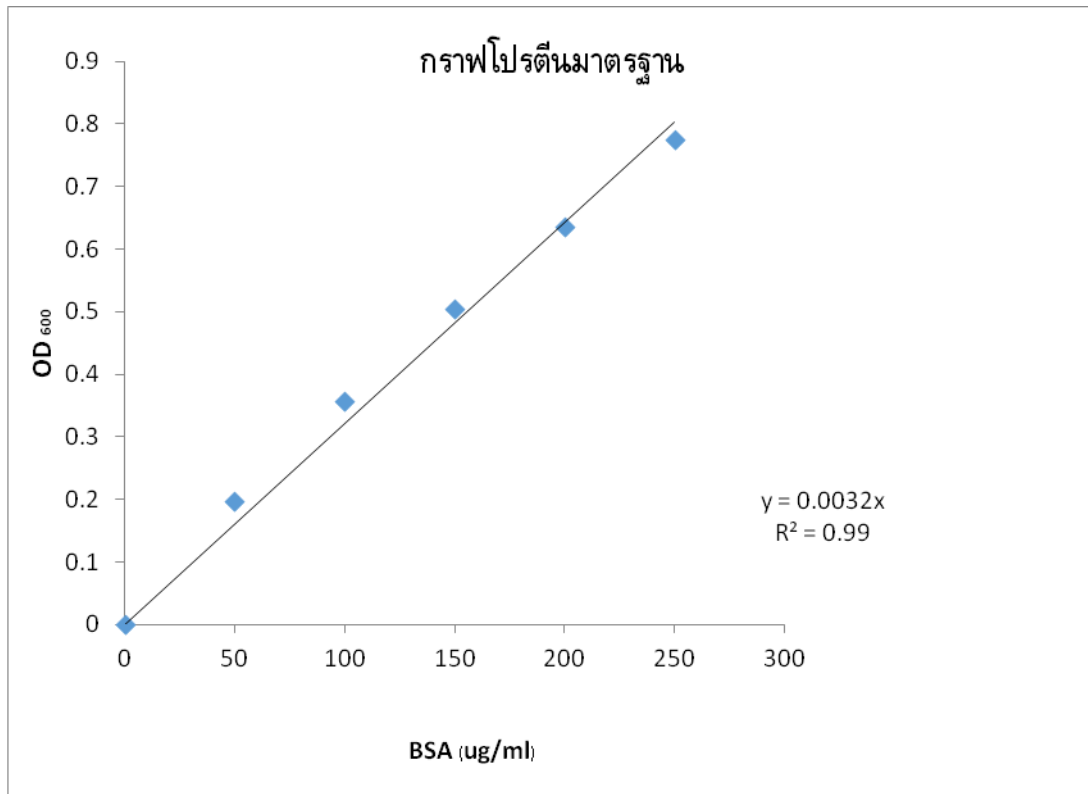
- Lowry solution A : 2% w/v Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH
- Lowry solution B : 0.5 % w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ Sodium potassium tartate 1 % w/v ผสมกัน ในอัตราส่วน 0.5 : 0.5

*Lowry's reagent = Lowry solution A (50 ml) : Lowry solution B(1 ml)

2. Folin – ciocalteu’ s Phenol reagent dilute กับน้ำอัตราส่วน 1:1
3. สารละลาย BSA 1000 $\mu\text{g/ml}$ (0.01 g/10 ml) (0.005 g/ 5 ml) (1.0 mg/ml) เก็บเป็น stock
4. test tube 10 อัน
5. spectrophotometer
6. micropipet 100, 1000 μl
7. vortex

ขั้นตอนการทดลอง

สารละลาย (ml)	Standard						ตัวอย่าง	
	blank	1	2	3	4	5	1	2
BSA (μl)	-	50	100	150	200	250	-	-
น้ำกลั่น (μl)	1000	950	900	850	800	750	750	750
สารละลายเอนไซม์ xylanase	-	-	-	-	-	-	250	250
ความเข้มข้น (μg/ml)	0	50	100	150	200	250		
	เติม Lowry หยดละ 3 ml, mix ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที							
	เติม Folin-ciocalteau ที่เจือจางอัตราส่วน 1:1, 0.3 ml Mix ให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที							
	นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง A600 nm							



การเตรียมสารที่ใช้ในการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE

1. สารละลาย acrylamide/bis (30%T,2.6% C)

Acrylamide	87.6 กรัม
N,N'-methylene-bis-acrylamide	2.4 กรัม
Double distilled water	300 มิลลิลิตร
เก็บที่ 4°C ในขวดสีชา	

2. สารละลาย 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Tris (hydroxyl metyl) aminomethane	18.17 กรัม
------------------------------------	------------

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย hydrochloric acid และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร และเก็บที่ 4°C

3. สารละลาย 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris (hydroxyl metty) aminomethane	6.07 กรัม
------------------------------------	-----------

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย hydrochloric acid และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร และเก็บที่ 4°C

4. สารละลาย 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

Sodium dodecyl sulphate (SDS)	10 กรัม
-------------------------------	---------

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. สารละลาย 10% ammonium persulphate (APS)

Ammonium persulphate (SDS)	0.1 กรัม
----------------------------	----------

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6. สารละลาย Electrode buffer pH 8.3 ความเข้มข้น 5 เท่า (5x)

Tris (hydroxyl metty) aminomethane	15 กรัม
Glycine	72 กรัม
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	5 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่ 4°C ก่อนใช้เจือจางให้เป็น 1X

7. สารละลาย 0.1%comassie brilliant blue R-250

comassie brilliant blue R-250	0.1 กรัม
methanol	40 กรัม

ละลายให้เข้ากันจากนั้นเติม glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. สารละลาย Destain solution

Methanol	400 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร

9. Solubilizing solution ความเข้มข้น 2 เท่า (2X)

Double distilled water	525 ไมโครลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	125 ไมโครลิตร
Glycerol	100 ไมโครกรัม
10% SDS	200 ไมโครกรัม
1% bromophenol blue	50 ไมโครกรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันและเก็บที่ 4°C

10. การเตรียมสารละลาย standard protein marker

Standard protein marker	1 vial
bromophenol blue solution	80 ไมโครลิตร
Double distilled water	9 ไมโครลิตร
10% SDS	10 ไมโครลิตร
β -mercaptoethanol	5 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เก็บที่ 4°C

protein marker

Protein	Mr (kDa)
Myosin	220
α_2 -Macroglobulin	170
β -Galactosidase	116
Transferrin	76
Glutamic dehydrogenase	53

การเตรียม sample buffer

Sample buffe for	ส่วนผสม
1. SDS-PAGE	Sample + 10% SDS + bromophenol blue solution + Double distilled water

การเตรียมเจล

Protein - staining

component	Final gel concentration	
	12% Separating gel (μl)	4% Stacking gel (μl)
30%Acrylamide/Bis	4,000	536
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,500	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	1,000
DDW	3,312	2,430
10% SDS	100	40
10% APS	80	25
TEMED	8	12.5