หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารสูตรอุดม (Rich medium)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Nutrient Broth (NB)	8	กรัม
NaCl	5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเติม Bacto-Agar 15 กรัมต่อลิตร นำไป autoclave ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารสูตรปรับต่ำ(Minimal salt medium)

ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

สารละลาย A	KH_2PO_4	4.4	กรัม
	Na_2HPO_4	4.8	กรัม
	$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปรับ pHให้เป็น6.0 แล้วเติมน้ำให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร นำไป autoclave

สารละลาย B	$CaCl_2.2H_2O$	0.05	กรัม
	$FeSO_4.7H_2O$	0.04	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไป autoclave

สารละลาย C เตรียมสารอาหารต้นตอที่ต้องการศึกษา (ความเข้มข้นที่ใช้คือ 10 มิลลิโมลาร์ สำหรับสารต้นตอไนโตรเจนและ 15 มิลลิโมลาร์ สำหรับสารต้นตอคาร์บอน) และ autoclave

ในการเตรียม Minimal salt medium ทำได้โดยผสม 100 มิลลิลิตรของสารละลาย A 1.0 มิลลิลิตร ของสารละลาย B และ 1.0 มิลลิลิตรของสารละลาย C ซึ่งเป็นสารอาหารต้นตอที่ต้องการศึกษา (เช่น กรดอะมิโนต่างๆ หรือ กลูโคส)

3.1.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของลอรี(Lowry และคณะ, 1951)

สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ ประกอบด้วย สารละลาย A สารละลาย B และ สารละลาย C

สารละลาย A ได้จากการละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B ได้จากการละลายคอปเปอร์(II)ซัลเฟต 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C ได้จากการละลายโพแตสเซียมทาร์เทรต 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A 100 มิลลิตร สารละลาย B 1 มิลลิลิตรและสารละลาย C 1 มิลลิลิตร ก่อนใช้

สารละลายฟินอลรีเอเจนต์(Phenol reagent)

ผสมโซเดียมทังสเตท 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดท 12.5 กรัม น้ำกลั่น 550 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ 25 มิลลิลิตร และ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร ต้มกลั่น(Reflux) ด้วยความร้อนต่ำ ๆ 10 ชั่วโมง เติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนมากเกินพอ 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น จนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น ก่อนการใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Standard Protein solution)

ละลาย Bovine serum albumine(BSA) เกรด A 10 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.1.3 สารละลายสำหรับหาโปรตีเอสแอคติวิตี

สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.2 โมลาร์

ละลายทริส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) 24.23 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.6 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

สารละลายกรดไตรคลอโรอะเซติก 10 เปอร์เซนต์

ละลายกรดไตรคลอโรอะเซติก 100 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์

ละลายเคซีน 0.5 กรัมในสารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ pH 7.6 100 มิลลิลิตร

3.1.4 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ กลูตามีน ซินเทส, กลูตาเมท ซินเทส กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส

สารละลายบัฟเฟอร์อิมิดาโซล-ไฮโดรคลอไรด์ 0.5 โมลาร์

ละลาย Imidazole 34.04 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

สารละลายโซเดียมกลูตาเมท 0.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมกลูตาเมท 9.35 กรัมในสารละลาย 0.5 โมลาร์ Imidazole-HCl buffer, pH 7.2 100 มิลลิลิตร

สารละลายเอดีโนซีนไตรฟอสเฟต 0.05 โมลาร์

ละลาย Adenosine-5'-triphosphoric acid(disodium dihydrogen salt)0.2755 กรัมในสารละลาย 0.5 โมลาร์ Imidazole-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.2 10 มิลลิลิตร

สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 1โมลาร์

ละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 12.32 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

สารละลายไฮดรอกซิลเอมีน 2 โมลาร์

ละลาย Hydroxylaminehydrochloride 13.89 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ก่อนใช้ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1โมลาร์ในอัตราส่วน 1:1

สารละลายเฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride solution)

ประกอบด้วยสารละลาย

ก. เฟอริกคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ในกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์

ข. กรดไตรคลอโรอะเซติก 24 เปอร์เซนต์

ค. กรดไฮโดรคลอริก 50 เปอร์เซนต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

ก่อนใช้ผสมสารละลายในข้อ ก, ข และ ค ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร

สารละลาย TME บัฟเฟอร์ (Tris-Mercaptoethanol-EDTA buffer)

ประกอบด้วยสารละลาย

ก. สารละลาย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.4

ข. สารละลาย 2-เมอร์แคบโต เอทธานอล 1 โมลาร์

ค. สารละลาย เอทธีลีนไดเอมีนเตตราอะเซติก (EDTA) 1 โมลาร์

ผสมสารละลาย ก, ข, ค ในอัตราส่วน 98:1:1โดยปริมาตร

สารละลายมาตรฐานแกมมากลูตามิล ไฮดรอกซาเมท 5 มิลลิโมลาร์

ละลาย L-Glutamic acid δ-monohydroxamate 0.0811 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

Slant NB-Agar ใช้สำหรับเก็บแบคทีเรียทั่วไป โดยบรรจุอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตรอุดมชนิดแข็ง ในหลอดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตรในลักษณะลาดเอียง เขี่ยแบคทีเรีย 1 โคโลนีจาก agar plate แล้ว streak ลงบน slant บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งแบคทีเรียเจริญเต็มที่ ปิดจุกด้วยพาราฟิน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2-3 เดือน

3.2.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เจริญแบคทีเรียในอาหารสูตรอุดมชนิดเหลว แล้วผสมกับกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ ในหลอดขนาด 20 มิลลิลิตร มีฝาเกลียวปิดทับด้วยพาราฟิน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ปี

3.3 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

3.3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น(Starter inoculum)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีจาก master plate หรือจาก Slant NB-Agar 1-2 loop ลงในอาหารสูตรอุดมชนิดเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.3 หน่วย คือ เชื้อเจริญเข้าช่วง log phase ถ้าการเจริญของแบคทีเรียยังไม่เพียงพอนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิต่อไปจนได้ การเจริญในช่วงที่ต้องการ

3.3.2 การเลี้ยงและการติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

ทำการถ่ายเชื้อโดยการดูดน้ำเลี้ยงจาก ข้อ 3.3.1 10 มิลลิลิตร ใส่ใน 100 มิลลิลิตร Mimimal salt medium ที่มี 15 มิลลิโมลาร์ ของสารอาหารต้นตอคาร์บอน(ได้แก่ ซิเตรท, กลีเซอรอล, ซัคซิเนท หรือ อัลฟาคีโตกลูตาเรท) หรือมี 10 มิลลิโมลาร์ของสารอาหารต้นตอไนโตรเจน (ได้แก่ กลูตาเมท, กลูตามีน, โพรลีน, ซีรีน, แอสปาราจีน, อาร์จีนีน, เคซีนไฮโดรไลเสท, แอมโมเนีย, ยูเรีย หรือ อิสติดีน) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีที่ห่อด้วยผ้าบางบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150-200 รอบ ต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20-30 ชั่วโมง และที่เวลาต่างๆเทน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร ออกมาวัดการเจริญโดยวัดความขุ่น ด้วยเครื่องมือสเปคโทรนิค 20 ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทั้งนี้เพราะเซลล์แบคทีเรีย ทำให้เกิดการกระจายแสงเป็นปฏิภาคโดยตรงกับจำนวนประชากรแบคทีเรีย

3.4 การแยกเอนไซม์โปรตีเอส

แยกเอนไซม์โดยการปั่นให้เซลล์ตกตะกอน ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะในห้องเย็น ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วเก็บส่วนน้ำใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีน

3.5 การเตรียมเซลล์และการแยกเอนไซม์กลูตามีน ซินเทส (GS) กลูตาเมท ซินเทส (GOGAT) และกลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส (GDH)

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียตามวิธีข้อ 3.3.2 (เลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตรในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร จนเจริญเข้าสู่ช่วง mid-log phase ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อ นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำตะกอนมาละลายใน TME บัฟเฟอร์ (Dave และ คณะ, 1970; Rebello และ Strauss,1969)ให้มีปริมาตรประมาณ 1 เปอร์เซนต์ของปริมาตรเดิม นำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง French pressure press ใช้ความดัน 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 3 ครั้ง ปั่นแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แยกส่วนน้ำใสไปวัดแอคติวิตีของ เอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีน

3.6 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

3.6.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

โดยวัดปริมาณ aromatic amino acid ที่เกิดจากปฏิกิริยาและละลายอยู่ใน trichloroacetic acid (TCA) 5 เปอร์เซนต์ ด้วยคุณสมบัติการดูดแสงช่วง ultraviolet(UV) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร(Juff, 1973; Richardson and Te Whaiti, 1978)

ผสมสารละลาย 0.5 เปอร์เซนต์ เคซีน 1 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 7.6 0.6 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ 0.4 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอ

โรอะเซติก 10 เปอร์เซนต์ ที่เย็น 2.0 มิลลิลิตร และนำไปแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที ปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอส มีหน่วยเป็น A_{280}/min/mg protein

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเปปไทด์หรือกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ 45 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทำการทดลองและมีผลให้เปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร 0.001 หน่วย

3.6.2 <u>การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ กลูตามีน ซินเทส (GS)</u>

กลูตามีน ซินเทส เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยา amination ของกรดกลูตามิก เพื่อเปลี่ยนไปเป็นกลูตามีน เมื่อมีแอมโมเนียมเป็นสารต้นตอไนโตรเจน หรือจะเปลี่ยนไปเป็น ɣ-glutamyl hydroxamic acid เมื่อมี hydroxylamine (NH_2OH) เป็นสารต้นตอไนโตรเจน

$$NH_3 + \text{L-glutamate} + ATP \xrightarrow{GS} \text{L-glutamine} + ADP + Pi$$

$$NH_2OH + \text{L-glutamate} + ATP \xrightarrow{GS} \text{ɣ-glutamyl hydroxamic acid} + ADP + H_3PO_4$$

วัดปริมาณของ ɣ-glutamyl hydroxamic acid ที่เกิดขึ้นโดยวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ช่วงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Elliot,1955) โดยเปรียบเทียบกับ ɣ-glutamyl hydroxamic acid มาตรฐาน แอคติวิตีจำเพาะมีหน่วยเป็น nmole/min/mg protein

การวัดเอนไซม์แอคติวิตี ทำโดย

ผสม 0.5โมลาร์ Imidazole-HCl buffer, pH 7.2, 0.65 มิลลิลิตร

0.05 โมลาร์ sodium ATP, pH 7.2, 0.5 มิลลิลิตร

0.5 โมลาร์ sodium glutamate 0.5 มิลลิลิตร

1.0 โมลาร์ magnesium sulfate, 0.1 มิลลิลิตร

และ 1.0 โมลาร์ hydroxylamine, 0.1 มิลลิลิตร

เติมปริมาณเอนไซม์ 0.4 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2.25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.75 มิลลิลิตร ferric chloride reagent แล้วนำไปปั่นให้โปรตีนตกตะกอน ส่วนน้ำใสนำไปวัดด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ช่วงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และหาปริมาณโปรตีน

3.6.3 <u>การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ กลูตาเมท ซินเทส (GOGAT) และกลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส (GDH)</u>

กลูตาเมท ซินเทส เป็นเอนไซม์ช่วยเร่งการสร้าง กลูตาเมท โดยปฏิกิริยา amination ของ α-ketoglutalate ด้วยกลูตามีน(ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาโดย กลูตามีน ซินเทส)

$$\alpha\text{-ketoglutarate} + \text{L-glutamine} \xrightarrow[NADPH \quad NADP^+]{GOGAT} 2\,\text{L-glutamate}$$

กลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส เป็นเอนไซม์ช่วยเร่งการสร้าง และสลายกลูตาเมท ในปฏิกิริยาการสร้างกลูตาเมท จะช่วยเร่งปฏิกิริยา amination ของ α-ketoglutarate ด้วยแอมโมเนียม และในปฏิกิริยาการสลาย กลูตาเมต จะช่วยเร่งปฏิกิริยา deamination ของกลูตาเมทไปเป็น α-ketoglutarate

$$NH_4 + \alpha\text{-ketoglutarate} \xleftrightarrow[NADPH \quad NADP^+]{GDH} \text{L-glutamate} + H_2O$$

แอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองสามารถวัดได้โดยวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของ

NADPH คือ การเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Aunstrup,1980) ค่าแอคติวิตีจำเพาะแสดงในหน่วย nmole NADPH oxidized/min/mg protein

การวัดเอนไซม์แอคติวิตีทำโดยผสมสารละลายเอนไซม์ 0.03-0.05 มิลลิลิตร ลงในส่วนผสมที่มี α-ketoglutarate (5 mM), NH_4Cl (40 mM) (ในการหา GDH) หรือ glutamine (5 mM)(ในการหา GOGAT) ทำปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 3.0 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (50 mM) pH 7.6 จากนั้นวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณ NADPH ที่ช่วงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.7 <u>การหาอัตราส่วนของซีรีน และ เมตัลโปรตีเอส</u>

เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ ในสภาวะที่มีตัวยับยั้งจำเพาะที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธีวัดแอคติวิตีตามข้อ 3.6.1 โดยใช้ phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF) เป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อซีรีนโปรตีเอส และethylenediaminetetracetic acid(EDTA) เป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อ เมตัลโปรตีเอส

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ pH 7.6 0.58 มิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์ 0.4 มิลลิลิตร และ PMSF หรือ EDTA 20 µl โดยให้มีความเข้มข้นของ PMSF และ EDTA ในปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 mM และ 5 mM ตามลำดับ (เนื่องด้วยต้องละลาย PMSF ใน เอทธานอล จึงต้องทำหลอดควบคุมโดยการเติมเฉพาะเอทธานอล ในปริมาณเดียวกับสารละลาย PMSF ที่ใช้และให้มีความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้ละลาย PMSF) นำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 นาที จึงเติม 0.5 เปอร์เซนต์ เคซีน 1 มิลลิลิตร เพื่อเริ่มปฏิกิริยา บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส ต่อไปนาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 10 เปอร์เซนต์ กรดไตรคลอโรอะเซติก 2 มิลลิลิตร ที่เย็น นำไปแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3.8 <u>การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี</u> (Lowry, 1959)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล. ผสมกับสารละลาย แอลคาไลน์ คอปเปอร์ ปริมาณ 3 มล. ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที เติม ฟินอลรีเอเจนต์ ปริมาณ 3.0 มล. เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณ โปรตีน ในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบ กับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ มีปริมาณโปรตีน 0 - 100 ไมโครกรัม