บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environmental incubator shaker) รุ่น G-25R ของ New Brunswick Scientific Co., Inc. U.S.A.
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น T-42K ของ Kontron Instrument, Italy.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan.
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของ Eutech Cybernetics, Singapore.
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic®401 ของ Milton Roy, U.S.A.
6. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของ Sartorius, U.S.A.
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd., Japan. และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan.
8. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 บริษัท ISSCO, U.S.A.
9. ตู้แช่แข็ง (Deep freezer) อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo Electronic Co., Ltd., Japan.
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของ Memmert, Germany.
11. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A.
12. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
13. เครื่องโครมาโทกราฟี (Low Pressure Liquid Chromatography) รุ่น Econo ของ BioRad, U.S.A.
14. เครื่องอิเลคโทรโฟริซิสแบบแผ่น (Slap gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของ BioRad, U.S.A.

2.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.
2. ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*o*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.
3. พารา-ไนโตรฟีนิล แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside) ของ Sigma, U.S.A.
4. พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ของ Sigma, U.S.A.
5. อะลูมินา (Alumina) ของ Sigma, U.S.A.
6. ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-gel A) ของ Bio-Rad, U.S.A.
7. เซฟาเด็กซ์ จี-200 (Sephadex G-200) ของ Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A.
8. ไซแลนจากไม้เบิร์ช (Xylan from birchwood) ของ Sigma, U.S.A.
9. อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
10. N,N'-เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-Methylene bis acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
11. N,N,N',N'-เททระเมธิลีนไดอามีน (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine, TEMED) ของ Sigma, U.S.A.
12. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) ของ Sigma, U.S.A.
13. สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-200 (Coomassie Brilliant Blue G-250) ของ Fluka, Switzerland.
14. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) ของ BDH, England.
15. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) ของ BDH, England.
16. 2-เมอร์แคบโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) ของ Sigma, U.S.A.
17. ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง ของ Sigma, U.S.A.

2.3 วิธีดำเนินการวิจัย

2.3.1 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7 และการเตรียมบีตา-ไซโลสิเดส

2.3.1.1 การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp. CH7

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. CH7 ในอาหารแข็งเอียงชนิด MS (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน จึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวแขวนลอย ดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้ มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก จ หมายเลข 1) นำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จึงเทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างสปอร์ด้วยน้ำ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยใน 20 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บเป็นปริมาตรน้อยๆ (aliquots) ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.3.1.2 การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. CH7

ถ่ายสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Streptomyces* sp. CH7 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไซแลน คอมเพล็กซ์ (Xylan complex medium) pH 7.0 ปริมาตร 30 มิลลิลิตรในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองเซลล์ *Streptomyces* sp. CH7 ที่เลี้ยงได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำหลายๆครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเตรียม บีตา-ไซโลสิเดส ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (1987) โดยนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยบดรวมกับผงอะลูมินาในโกร่ง ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักเซลล์เปียกต่อผงอะลูมินาเท่ากับ 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.5 เพื่อเป็นตัวทำละลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส และปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส

การตรวจสอบแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Nakanishi และคณะ (1987) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 และสารละลายบีตา-ไซโลสิเดส ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1 หน่วยของบีตา-ไซโลสิเดส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ แล้วให้ พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะข้างต้น

2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.3) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.4) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3.4 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์

2.3.4.1 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนบีตา-ไซโลสิเดส

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่บดละเอียดอย่างช้าๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วนคือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60 และ 60-70 เปอร์เซ็นต์ แต่ละลำดับส่วนกวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกส่วนตะกอนและน้ำใสออกจากกัน ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ของแต่ละลำดับส่วนด้วย 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ดังกล่าว หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส

2.3.4.2 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.3.4.1 พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกส่วนตะกอนและน้ำใสออกจากกัน ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แลกเปลี่ยนอิออนลบ คือ 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ผสม 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล ในปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนโปรตีนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์เดิม ครั้งสุดท้ายไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ผสม 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล และ 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และ แอคติวิตีของไซโลสิเดส

2.3.4.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.3.4.3.1 ผลของความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 2.3.4.2 ปริมาณเท่าๆกัน บ่มกับสับสเตรทและโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ นำไปหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสตามวิธีการในข้อ 2.3.2

2.3.4.3.2 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethylmaleimide) ในการยับยั้งการทำงานของบีตา- ไซโลสิเดส

บ่มบีตา-ไซโลสิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 2.3.4.2 ปริมาณเท่าๆกัน ในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่เหลืออยู่ตามวิธีการในข้อ 2.3.2

2.3.4.3.3 ผลของ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) ในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethylmaleimide)

บ่มบีตา-ไซโลสิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 2.3.4.2 ปริมาณเท่าๆกัน ในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 นาที จากนั้นเติม 2-เมอร์แคบโตเอธานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-8 มิลลิโมลาร์ และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่เหลืออยู่ตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยมีบีตา-ไซโลสิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์และ 2-เมอร์แคบโตเอธานอลเป็นตัวเปรียบเทียบ

2.3.4.3.4 ผลของ 2-เมอร์แคบโตเอธานอลต่อแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส

บ่มบีตา-ไซโลสิเดสในปริมาณเท่าๆกันใน 2-เมอร์แคบโตเอธานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-20 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยมีบีตา-ไซโลสิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มใน 2-เมอร์แคบโตเอธานอลเป็นตัวเปรียบเทียบ

2.3.4.3.5 การทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

ล้างสารแขวนลอยดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียด (fine particles) ที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆครั้งจนไม่มีเม็ดเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ ครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 นำเจล คอลัมน์ และสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้ไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 15-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 27 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 48 มิลลิลิตร ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-70 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออกโดยใช้ 300-1000 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์เกรเดียนท์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล เก็บลำดับส่วนละ 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวบรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสสูงเข้าด้วยกัน ลดปริมาตรตัวอย่างโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล (molecular weight cut-off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำไปไดอะไลส์ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล 2 ครั้ง ครั้งแรก 4-6 ชั่วโมง ครั้งที่ 2 ไดอะไลส์ข้ามคืน สุดท้ายนำไปไดอะไลส์ใน100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล และ 30 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล 6-8 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ แอคติวิตี และปริมาณโปรตีน

2.3.4.3.6 การทำบีตา-ไซโลสิเดสบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-200 ในน้ำกลั่นปริมาตรมากเกินพอ โดยค่อยๆโปรยผงเจลลงในน้ำกลั่น ใช้แท่งแก้วกวนเบาๆให้เจลแขวนลอยเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อให้เจลพองตัวเต็มที่ ปล่อยให้เย็น เทส่วนน้ำใส พร้อมเจลละเอียด (fine particles) ทิ้ง ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง ครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 50 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ผสมอยู่ นำเจล คอลัมน์ และสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้ไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 15-30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 46 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 81.3 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 50 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ และ 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล ผสมอยู่ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ได้จากข้อ 2.3.4.3.5 มาใส่ลงลนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์เดิม เก็บลำดับส่วนละ 0.6 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีในแต่ละลำดับส่วน รวบรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีสูงเข้าด้วยกัน นำไปไดอะไลส์ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคบโตเอธานอล และ 30 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลผสมอยู่ ประมาณ 6-8 ชั่วโมง วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ แอคติวิตี และปริมาณโปรตีน

2.3.5 **การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของบีตา-ไซโลสิเดส โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส** (Native polyacrylamide gel electrophoresis) **ดัดแปลงจากวิธีการของ** Laemmli (1970)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3 x 10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3 x 10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.7) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ซับน้ำออก เทสารละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.8) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.1) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโทรโฟริซิส เติมอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอีเลคโทรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานมาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.5) เตรียมให้ได้ความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเท่ากัน หยอดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอีเลคโทรโฟริซิสที่ 200 โวลท์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว และย้อมสีโปรตีน (Dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน สำหรับการย้อมแอคติวิตี (activity staining) ทำโดยแช่เจลใน พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบสีเหลืองของพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น

2.3.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดส

2.3.6.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดส โดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ คะตะเลส โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และ ไซโทโครม ซี ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 232,000, 66,000 และ 13,237 ดาลตัน ตามลำดับ ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ในภาวะเดียวกับที่ใช้ทำบีตา-ไซโลสิเดสให้บริสุทธิ์ในข้อ 2.2.4.3.6 นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีน

2.3.6.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดส โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสและติดตามด้วยการย้อมแอคติวิตีแล้วแยกออกจากเจล และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน มาทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3 x 10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3 x 10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.4) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ซับน้ำออก เทสารละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.6) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโทรโฟรีซิส เติมอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอีเลคโทรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานมาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.3) หยอดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอีเลคโทรโฟริซิสที่ 200 โวลท์ จนสีของบรอมฟีนอลบลู

เคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว และย้อมสีโปรตีน (Dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออก ด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิเดสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของบีตา-ไซโลสิเดสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

2.3.7 **การศึกษาสมบัติของบีตา-ไซโลสิเดสจาก** *Streptomyces* sp. CH7

2.3.7.1 **อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส**

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส

2.3.7.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยแปรความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างต่างๆดังนี้

100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0-6.5
100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0-8.5
100 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0-9.0

2.3.7.3 ความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่ออุณหภูมิ

บ่มบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิในช่วง 35-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยมีบีตา-ไซโลสิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

2.3.7.4 ความเสถียรของบีตา-ไซโลสิเดสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่ pH 4.0-9.0 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆดังระบุในข้อ 3 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยมีบีตา-ไซโลสิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

2.3.7.5 การหาค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (K_m) ของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาผสมกับสับสเตรท คือ พารา- หรือ ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายขณะทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.5-10.0 มิลลิโมลาร์ นำไปหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดส ตามวิธีการในข้อ 2.3.2

2.3.7.6 ผลของไซโลสในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยเติมไซโลสลงไปด้วยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไซโลสอยู่ในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์

2.3.7.7 ผลของอะราบิโนสในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยเติมอะราบิโนสลงไปด้วยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของอะราบิโนสอยู่ในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์

2.3.7.8 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 2.3.2 โดยเติมอิออนของโลหะชนิดต่างๆลงในสารผสมของปฏิกิริยา ที่ความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิโมลาร์ ดังนี้

แคลเซียมคลอไรด์	($CaCl_2.2H_2O$)
โคบอลคลอไรด์	($CoCl_2.6H_2O$)
คอปเปอร์ซัลเฟต	($CuSO_4.5H_2O$)
เฟอรัสซัลเฟต	($FeSO_4.7H_2O$)
เมอร์คิวรี่คลอไรด์	($HgCl_2$)
แมกนีเซียมซัลเฟต	($MgSO_4.7H_2O$)
แมงกานีสซัลเฟต	($MnSO_4.H_2O$)
นิเกิลคลอไรด์	($NiCl_2.6H_2O$)
ซิงค์ซัลเฟต	($ZnSO_4.7H_2O$)

โดยมีบีตา-ไซโลสิเดสในปฏิกิริยาที่ไม่เติมอิออนโลหะเป็นตัวเปรียบเทียบ

2.3.7.9 การตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) ของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน มาตรวจสอบความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) โดยใช้สารประกอบชนิดต่างๆดังต่อไปนี้

p-nitrophenyl β-D-xylopyranoside (*p*-NPX), 5 มิลลิโมลาร์

o-nitrophenyl β-D-xylopyranoside (*o*-NPX), 5 มิลลิโมลาร์

p-nitrophenyl α-L-arabinofuranoside (*p*-NPAF), 1 มิลลิโมลาร์

ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (Oat spelt xylan), 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ไซแลนจากไม้เบิร์ช (Birchwood xylan), 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับ *p*-NPX, *o*-NPX และ *p*-NPAF วิเคราะห์ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาตามวิธีการในข้อ 2.3.2

ส่วนไซแลนใช้เป็นสับสเตรทในการวิเคราะห์แอคติวิตีของไซแลเนสของบีตา-ไซโลสิเดส โดยการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดจากการย่อยสลายไซแลน ในปฏิกิริยาที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ (1984) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาคือ

0.1 มล.ของสารละลายไซแลนความเข้มข้น 10 มก.ต่อมล. ซึ่งละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5

0.8 มล. ของ 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.5

0.1 มล. ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Somogyi (1951) และ Nelson (1944) โดยนำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล. เติมสารละลายอัลคาไลด์คอปเปอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.1) 1 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมสารละลายเนลสัน (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.2) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำ 5 มล. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

2.3.7.10 การตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลสของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลสโดยวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 มล. ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม 0.5 มล. ของสารละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสความเข้มข้น 10 มก.ต่อมล. ละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปหาน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีใช้กรดไดโนโตรซาลิไซลิก (Miller, 1959) โดยนำสารละลายตัวอย่าง 1 มล. ผสมกับสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข หมายเลข 4.3) 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ

I20608822

2.3.7.11 การตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสของบีตา-ไซโลสิเดส

นำบีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาตรวจสอบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสโดยนำเอนไซม์มา 0.5 มล. เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย

0.6 มล. ของ 0.5 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

0.1 มล. ของ 0.1 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต

0.2 มล. ของ 0.001 โมลาร์ โคบอลท์คลอไรด์

0.5 มล. ของ 2.0 โมลาร์ กลูโคส

เติมน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาณสุดท้ายเป็น 2.0 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายที่เวลา 0, 10, 20 และ 30 นาที นำมาเจือจาง 300 เท่า ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายนี้ 0.5 มล. ไปหาปริมาณน้ำตาลฟรักโทสโดยวิธีการของ Marshall และ Kooi (1957) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dische และ Borenfreund (1951) โดยนำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์มาเติม 3 มล. ของ 70 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟุริก 0.1 มล. ของ 1.5 เปอร์เซ็นต์ cysteine.HCl แล้วเติม 0.1 มล. ของ 0.12 เปอร์เซ็นต์ alcoholic carbazole ทันที ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลฟรักโทสจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรักโทสความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรักโทส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทดสอบ