บทที่ 3

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยและวิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

-เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) รุ่น Gyromax™ 707R ของบริษัท Amerex Instrument, Inc., USA.

-อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W-760 ของบริษัท Memmert, Germany

-เครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge)

- ชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kontron Instrument, Germany
- ชนิดปั่นสารจำนวนน้อย (Micro centrifuge) รุ่น 7M spectrafuge ของบริษัท LABNET, USA.

-เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic® 401 ของบริษัท Milton Roy, USA.

-เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น Lambda25 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.

-เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan pH2000 ของบริษัท Corning, USA.

-เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy Seiko, Japan

-เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA.

-เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น VSM-3 ของบริษัท Shelton Scientific, USA.

-ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA.

-ตู้อบแห้ง (dryer) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert, Germany

-เครื่องอิเลคโทรโฟริซิสแบบแผ่น (slap gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของบริษัท BioRad, USA.

-เครื่องโครมาโทกราฟี (low pressure liquid chromatography) รุ่น Econo ของบริษัท BioRad, USA.

-เครื่องเก็บสารตัวอย่าง (fraction collector) รุ่น FRAC-100 ของบริษัท Pharmacia, USA.

-กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) รุ่น CH30 ของบริษัท Olympus optical Co.Ltd,Japan

-ตู้เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส(freezer) รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sanyo, Japan

-เครื่องชั่งไฟฟ้า (balance)

- ชนิดอ่านละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น L 2200p ของบริษัท Sartorius, Germany
- ชนิดอ่านละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PB 3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland

-ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany

-เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น Sonorex RK100 ของบริษัท Bandelin electronic, Germany

-หลอดลดปริมาตร (concentrator tube) คัดขนาดโมเลกุล (molecular weight cut-off) 10,000 ดาลตัน ของบริษัท Sartorius, Germany

-กล้องถ่ายภาพดิจิตอล (Digital camera) รุ่น Marvica ของบริษัท Sony, Japan

สารเคมีที่ใช้วิจัย

-Hammarstein casein ของบริษัท Merck, Germany

-ไตรคลอโรอะซิติกแอซิด (Trichroloacetic acid) ของบริษัท Merck, Germany

-แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammoniumsulfate) ของบริษัท BDH, England

-ทรีซมา เบส (Trizma® base) ของบริษัท Sigma, USA.

-อีดีทีเอ (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ของบริษัท BioRad, USA.

-พีเอ็มเอสเอฟ (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) ของบริษัท Nacalai Tecque, Japan

-สิ่งสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

-สิ่งสกัดจากเนื้อ (Beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

-สกิม มิลค์ พาวเดอร์ (Skim milk powder) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma, USA.

-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany

-กรดไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid) ของบริษัท Merck, Germany

-กรดอะซิติก (Acetic acid) ของบริษัท Merck, Germany

-ดีอีเออี ไบโอ-เจลเอ (DEAE Bio-gel A) ของบริษัท BioRad, USA.

-อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของบริษัท Sigma, USA.

-N,N'-เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-Methylene bis acrylamide) ของบริษัท Sigma, USA.

-N,N,N',N'-เททระเมธิลีนไดอามีน (N,N,N',N'-tetramethylenediamine, TEMED) ของบริษัท Sigma, USA.

-แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) ของบริษัท Sigma, USA.

-ชุดสำเร็จรูปย้อมสี ซิลเวอร์สเตนนิง (Silver staining kit) ของบริษัท Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden

-สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) ของบริษัท Fluka, Switzerland

-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate,SDS) ของบริษัท BDH, England

-ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลช่วงกว้าง (Broad range) ของบริษัท Promega, USA.

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ทนอุณหภูมิสูง จากตัวอย่างดิน และน้ำ

3.1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ และดินเพื่อแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอส

เก็บตัวอย่างน้ำจากน้ำพุร้อน โดยเก็บน้ำจากแอ่งน้ำ และดินจากขอบแอ่งน้ำ ใส่ในภาชนะที่เก็บความร้อน (รายละเอียดดังตารางที่ 4.1) จากนั้นนำตัวอย่างกลับมายังห้องปฏิบัติการ แล้วนำตัวอย่างไปบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยอาหารเหลว BY ที่มี skim milk 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร(ภาคผนวก ก)) ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน โดยใส่น้ำตัวอย่าง 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) และใส่ดินตัวอย่าง 5%(น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ส่งออกมานอกเซลล์

การแยกจุลินทรีย์ทำโดยการนำน้ำจากตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์จากข้อ 1 มาหยดลงบนจานอาหารแข็ง BYที่มี 1% skim milk (ปานใจ วงศ์วิริยะ, 2542) ซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลว BY ที่มี 1% skim milk และวุ้นผง 1.8 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 0.1 มิลลิลิตร แล้วทำการเกลี่ยให้ทั่วจาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

(โดยใส่จานเลี้ยงเชื้อในถุงพลาสติกที่มีสำลีชุบน้ำอยู่ข้างในถ้วยเล็กๆเพื่อไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งเร็ว) ถ้ามีแอคติวิตีของโปรติเอสจะเกิดวงใสรอบโคโลนีของจุลินทรีย์บนจานอาหารวุ้นเนื่องจากการไฮโดรไลซ์ เคซีนในน้ำนม เขี่ยโคโลนีที่มีวงใสมาใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออันใหม่ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพื่อเลือกโคโลนีที่มีวงใสอีก ทำซ้ำ ๆ กันแบบนี้หลาย ๆ ครั้งจนได้โคโลนีที่มีจุลินทรีย์ชนิดเดียว

3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดได้

เลือกโคโลนีจากข้อ 3.1.2 คัดโคโลนีที่ให้วงใสรัศมีกว้างกว่าโคโลนีตั้งแต่ 0.25 ซม.ขึ้นไปมาศึกษา โดยตรวจสอบรูปร่างของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้โดยการนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์, ตรวจสอบการย้อมติดสีของแกรม, ศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการ และจัดจำแนกชนิดโดยอ้างอิงจาก Bergey's manual of determinative bacteriology (1994)

3.2.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย นำไอโซเลตที่ได้มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BY medium ที่มี 1% skim milk บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 1 วัน สังเกตรูปร่าง ขนาด สี ของโคโลนีที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว

3.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Gerhardt และคณะ, 1981)

<u>การติดสีแกรม</u> นำแต่ละไอโซเลตจากข้อ 2.1 มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งเพื่อให้เซลล์ติดกับแผ่นสไลด์ จากนั้นย้อมสีเซลล์โดยการหยดสารละลายแกรมคริสตัลไวโอเลต (Gram's crystal violet solution (ภาคผนวก ข)) ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำแล้วย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน (Gram's iodine solution (ภาคผนวก ข)) 1 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95% เอธานอล และล้างน้ำทันที ย้อมต่อด้วยสารละลายแกรมซาฟรานินโอ (Gram's safranin solution (ภาคผนวก ข)) 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

<u>การย้อมสีสปอร์</u> นำแต่ละไอโซเลตจากข้อ 2.1 ที่ปล่อยให้เจริญเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เป็นเซลล์แก่ มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วหยดสารละลายมาลาไคท์กรีน (malachite green (ภาคผนวก ข)) ใช้ไฟลนใต้แผ่นสไลด์ให้เกิดเป็นไอ 1-2 นาที คอยหยดสีเติมลงไปเพื่อไม่ให้สีแห้ง ล้างด้วยน้ำ 30 วินาที จากนั้นย้อมด้วยสีซาฟรานินโอ

นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เอนโดสปอร์จะติดสีเขียว และเซลล์จะติดสีแดง

<u>การเคลื่อนที่</u> นำแต่ละไอโซเลตมาปลูกแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test medium (ภาคผนวก ก)) บ่มเชื้อนาน 18-24 ชม. ถ้าการเจริญของเชื้อออกนอกรอยปักเชื้อหรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนแต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม แสดงว่าเชื้อเคลื่อนที่ได้ แต่ถ้าเห็นการเจริญและมีขอบเขตชัดเจนแสดงว่าให้ผลเป็นลบ

3.2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Gerhardt และคณะ, 1981)

<u>การสร้างแคตะเลส</u> หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีความเข้มข้น 3% ลงบนโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสร้างแคตะเลสได้

<u>การเจริญในภาวะไร้อากาศ</u> เลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไธโอไกลโคเลต (thioglycolate broth(ภาคผนวก ก)) เป็นเวลา 2 วัน สังเกตการเจริญภายในหลอด ถ้าเจริญที่ผิวแสดงว่าเป็น aerobic bacteria ถ้าเจริญที่ก้นหลอดแสดงว่าเป็น anaerobic bacteria ส่วนในหลอดที่เจริญได้ทั้งหลอดแสดงว่าเป็น facultative anaerobic bacteria

<u>การสร้างออกซิเดส</u> หยดสารละลาย tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ความเข้มข้น 1% ลงบนกระดาษกรอง แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อกระจายให้ทั่วกระดาษกรอง ถ้าแบคทีเรียเป็นสีม่วงภายใน 10 วินาทีแสดงว่าสร้างออกซิเดสได้

<u>การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต</u> เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวฟีนอล เรด เบส (phenol red broth base (ภาคผนวก ก)) ที่มี 1%ของน้ำตาลแต่ละชนิด สังเกตการสร้างกรดได้โดยแบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตสร้างกรดขึ้น ทำให้สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเหลือง ซึ่งเป็นผลบวก และสามารถสังเกตการสร้างแก๊สโดยการใส่หลอดดักแก๊ส (Durham's tube)

<u>การทดสอบรีดิวซ์ไนเตรต</u> เลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนเตรต (nitrate broth (ภาคผนวก ก)) บ่มเชื้อนาน 18-24 ชม. แล้วเติม 0.5 % อัลฟา แนพธิลามิน (0.5% α-

naphthylamine (ภาคผนวก ข)) และกรดซัลฟานิลิก 0.8% (0.8% sulfanilic acid (ภาคผนวก ข)) อย่างละ 5 หยด ถ้าสารละลายมีสีแดงอมชมพูเกิดขึ้น หรือไม่เกิดสีในตอนแรกและเมื่อเติมผงสังกะสีเข้าไปก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงมีการรีดิวซ์ไนเตรต แต่ถ้าเติมผงสังกะสีแล้วมีสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่าเป็นผลลบ

การทดสอบ Voges-Proskauer เลี้ยงเชื้อในอาหารเอ็มอาร์-วีพี (ภาคผนวก ก) นาน 2 วัน นำ 1 มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อมาเติม 5% α-napthol ที่ละลายใน absolute ethanol 0.2 มล.

การทดสอบการสร้างอินโดล เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอินโดล (indole broth (ภาคผนวก ก)) เป็นเวลา 2 วัน เติมสารละลายโคแวคส์ (Kovac's solution(ภาคผนวก ข)) เพื่อตรวจสอบสารอินโดลที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าแบคทีเรียสามารถสร้างอินโดลได้จะเกิดสีแดงบนผิวหน้าอาหาร

การทดสอบการย่อยแป้ง เลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสตาร์ช (starch agar (ภาคผนวก ก)) เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วราดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วจานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BY medium ที่มี 1% skim milk นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40,45,50,55,60,65,70 และ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 วัน ถ้ามีการเจริญของเชื้อแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

การทดสอบการเจริญที่ pH 5.7 เลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BY medium ที่มี 1% skim milk และปรับ pH เป็น 5.7 บ่มเชื้อ 1-5 วัน ถ้ามีการเจริญของเชื้อแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

การทดสอบผลของ NaCl ที่มีต่อการเจริญ เลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BY medium ที่ใส่ 1% skim milk และมี NaCl ความเข้มข้น 5% และ 10% ตามลำดับ นำไปบ่มเป็นเวลา 1-5 วัน ถ้ามีการเจริญของเชื้อแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

<u>การทดสอบการใช้ซิเตรต</u> เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งทดสอบการใช้ซิเตรต (Simmons citrate medium (ภาคผนวก ก)) นำไปบ่ม 1-3 วัน ถ้าเกิดสีน้ำเงินในอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่าเชื้อสามารถใช้ซิเตรตได้

3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตโปรติเอส

คัดเลือกเชื้อที่มีแอคติวีตีของโปรติเอสมากที่สุดมาทำการทดลองต่อไป

3.3.1 การวัดแอคติวิตีของโปรติเอส

<u>การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอสโดยวิธี casein digestion (ดัดแปลงจาก Millet ,1970)</u>
ใส่ 1 ml. ของ 1% เคซีนซึ่งละลายอยู่ใน 0.05 M ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.0 (ภาคผนวก ข) นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. บ่มเป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งแล้วเติม 10% ทีซีเอ (กรดไตรคลอโรอะซิติก) 2 มล. เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรของสารละลายใสเหนือตะกอน Blank คือใส่ 10%ทีซีเอก่อนที่จะใส่สารละลายเอนไซม์

หนึ่งหน่วยโปรติเอส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอนที่ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร เท่ากับ 0.01 หน่วย ต่อหนึ่งนาที

<u>การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และ คณะ,1951)</u> นำสารตัวอย่าง 1 มล. เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวก ข) 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร คำนวณค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin) ปริมาณ 0-200 ไมโครกรัม

3.3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตโปรติเอส

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบุข้อ 3.1.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของโปรติเอส ทุกๆ 2 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 ตรวจหา pH ที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตโปรติเอสของเซลล์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบุข้อ 3.1.1 ปรับ pH ในแต่ละขวดเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0, 7.0 และ 8.0 ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของโปรติเอสทุกๆ 2 ชั่วโมง

3.4 การทำให้โปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.4.1 การเตรียม crude เอนไซม์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบุข้อ 3.1.1 และใช้สภาวะเลี้ยงตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.3.2 และ 3.3.3 จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อมาปั่นแยกตะกอน ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทเอาส่วนน้ำใสเก็บไว้

3.4.2 การตกตะกอนโปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำ crude เอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด โดยค่อยๆโปรยผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป ขณะกวน crude เอนไซม์เบาๆด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เพิ่มความเข้มข้นอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมใน crude เอนไซม์เป็นลำดับส่วนตั้งแต่ 0-80 % แต่ละลำดับส่วน ปล่อยให้แอมโมเนียมซัลเฟตละลายใน crude เอนไซม์ประมาณ 2-3 ชม. แล้วนำไปปั่นแยกตะกอน ใช้ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนของแต่ละส่วนด้วย 0.05 M ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.0 (ภาคผนวก ข) โดยใช้บัฟเฟอร์ให้น้อยที่สุดเท่าที่จะละลายตะกอนได้หมด นำตะกอนที่ละลายแล้วไปวัดแอคติวีตีของโปรติเอส เพื่อหาช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เอนไซม์ตกตะกอนแล้วนำไปไดอะไลซ์ (Scope 1994) เพื่อเจือจางเกลือแอมโมเนียมให้เหลือน้อยที่สุด ซึ่งตรวจสอบโดยการใช้สารละลายอิ่มตัวของแบเรียมคลอไรด์ แล้วนำเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไป

3.4.3 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอเจล เอ

<u>การเตรียมคอลัมน์</u> ล้างสารแขวนลอยดีอีเออี ไบโอเจล เอ ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วทิ้งไว้ให้เจลตกตะกอน แล้วเทส่วนน้ำที่ไม่ตกตะกอนไปพร้อมกับเจลละเอียด (fine particles) ที่อยู่ด้านบนทิ้ง ทำเช่นเดิมซ้ำๆเพื่อกำจัดเม็ดเจลละเอียดที่แขวนลอยออก

นำเจล, คอลัมน์ และบัฟเฟอร์ที่ต้องใช้ไปกำจัดอากาศออกโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง(sonicator)ภายใต้ภาวะสุญญากาศ แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. สูง 25 ซม. ปริมาตรเจล 44.19 มล. ผ่าน 0.05 M ทรีส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.0 ลงในคอลัมน์ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มล.ต่อ ชม.

<u>การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน</u> นำสารละลายโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านการกำจัดเกลือโดยวิธีไดอะไลซ์จากข้อ 3.4.2 มาใส่ลงในคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอเจล เอ โดยค่อยๆใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับเจลด้วยบัฟเฟอร์เดียวกับขั้นตอนเตรียมคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 30 มล.ต่อ ชม. ติดตามโปรตีนด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออกโดยใช้ 0-1 M โซเดียมคลอไรด์ เกรเดียนท์ใน 0.05 M ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.0 เก็บส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มล. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและวัดแอคติวีตีในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นจากนำส่วนที่มีแอคติวีตีสูงมารวมกัน ลดปริมาตรตัวอย่างโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล (molecular weight cut-off) 10,000 ดาลตัน วัดปริมาตร, วัดแอคติวีตีและวัดปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ที่ได้

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรติเอสและการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอส

โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) จากวิธีการของ Laemmli (1970)

นำโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน มาทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3 x 10.2 ซม. และขนาด 7.3 x 10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มล. สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ที่มีความเข้มข้น 12 % (ภาคผนวก ข) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 ซม. เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 ซม. ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วซับน้ำออก จากนั้นจึงเทสารละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 % (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงไป

ระหว่างแผ่นแก้ว แล้วตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) นำแผ่นเจลที่ได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเลคโทรโฟริซิส เติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเลคโทรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานมาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข) เตรียมให้ได้ความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเท่ากัน หยอดแต่ละตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอิเลคโทรโฟริซิสที่ 200 โวลท์ จนสังเกตเห็นสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว แล้วย้อมสีโปรตีน (Dye staining) ด้วยวิธีซิลเวอร์สเตนนิง (silver staining) (ภาคผนวก ข) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน สำหรับการย้อมแอคติวีตี (activity staining) (ภาคผนวก ข) ทำโดยแช่เจล SDS-PAGE ใน 2.5 % ไทรทรอนเอ็กซ์-100 ใน 0.1 M ทรีส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.0 นาน 30 นาทีเพื่อกำจัด SDS ออกจากแผ่นเจล แล้วใช้แผ่นเจลที่มีซับสเตรต (ดัดแปลงจาก วทัญญุตา ภู่โยธิน(2544)) ไปประกบกับ SDS-PAGE เจล โดยใช้แผ่นกระจกรองแล้วหล่อด้วย 0.05 M ทรีส ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.0 ระวังไม่ให้เจลแห้งหรือเปียกเกินไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชม. นำแผ่นเจลที่มีซับสเตรตไปย้อมสีโปรตีน ด้วยสีคูแมสซี บลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution(ภาคผนวก ข)) เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าเบาๆตลอดเวลา) แล้วล้างสีส่วนเกินออก ด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution (ภาคผนวก ข))จนเห็นแถบใสบริเวณที่แถบโปรติเอส ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของโปรติเอสเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

3.6 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโปรติเอส

3.6.1 อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวัดแอคติวีตีตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 30, 37, 45, 55, 65, 75, และ 85 องศาเซลเซียส นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ของแอคติวิตีของโปรติเอสและอุณหภูมิ โดยใช้ค่าแอคติวิตีที่วัดได้มากที่สุดเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.6.2 ความเสถียรของโปรติเอสต่ออุณหภูมิ

นำโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 37, 45, 55, 65, 75, 85และ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวีตีตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยมีโปรติเอสที่ไม่ได้บ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.6.3 อิทธิพลของค่าความเป็นกรดด่างที่มีต่อแอคติวิตีของโปรติเอส

บ่มโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ของแอคติวิตีของโปรติเอสและ pH โดยใช้ค่าแอคติวิตีที่วัดได้มากที่สุดเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.6.4 ความเสถียรของโปรติเอสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆดังข้อ 3.6.3 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวีตีตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยมีโปรติเอสที่ไม่ได้บ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.6.5 อิทธิพลของสารยับยั้งต่อการทำงานของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวัดแอคติวีตีตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยเติมตัวยับยั้งชนิดต่างๆลงในสารผสมของปฏิกิริยาให้ได้ความเข้มข้นของอิออนโลหะเป็น 10-100 มิลลิโมลาร์ ก่อนที่จะนำไปบ่ม ดังนี้

อีดีทีเอ	(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)
พีเอ็มเอสเอฟ	(phenylmethylsulfonyl fluoside, PMSF)

3.6.6 อิทธิพลของอิออนโลหะต่อการทำงานของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวัดแอคติวีตีตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยเติมอิออนของโลหะชนิดต่างๆลงในสารผสมของปฏิกิริยาให้ได้ความเข้มข้นของอิออนโลหะเป็น 10 มิลลิโมลาร์ ก่อนที่จะนำไปบ่ม ดังนี้

แคลเซียมคลอไรด์($CaCl_2 \cdot 2H_2O$),	โคบอลคลอไรด์($CoCl_2 \cdot 6H_2O$),
คอปเปอร์ซัลเฟต($CuSO_4 \cdot 5H_2O$),	เฟอรัสซัลเฟต($FeSO_4 \cdot 7H_2O$),
แมกนีเซียมคลอไรด์($MgCl_2 \cdot 2H_2O$),	แมงกานีสคลอไรด์($MnCl_2 \cdot 4H_2O$),
นิเกลคลอไรด์($NiCl_2 \cdot 6H_2O$),	ซิงค์ซัลเฟต($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$),
ซิลเวอร์ไนเตรต($AgNO_3$) และ	แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)