หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลี้ยงเชื้อสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1

1.1 การเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmayer flask)

เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำ (spore suspension) โดยเทน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บเชื้อ (stock culture) ซึ่งมีสปอร์แก่จัด (อายุประมาณ 5-7 วัน) และใช้ลูป (loop) เขี่ยให้สปอร์หลุดออกมาอยู่ในน้ำ หลังจากนั้นนำสปอร์แขวนลอยนี้ 5 มิลลิลิตรถ่ายลงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อ (starter) (ภาคผนวกที่ 3) 50 มิลลิลิตรในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตรจำนวน 4 ขวด บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific, Co., Inc., U.S.A. รุ่น G-27) ที่ 30 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหัวเชื้อนี้ 5 มิลลิลิตรหรือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลวทั้งหมดถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ (ภาคผนวกที่ 4) 50 มิลลิลิตรในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 40 ขวด บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองเซลที่ได้ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างเซลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำมาสกัดแยกเอนไซม์จากเซลซึ่งจะได้กล่าวต่อไปในข้อ 5

1.2 การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (Fermentor)

เตรียมหัวเชื้อโดยวิธีการเดียวกับข้อ 1.1 จำนวน 8 ขวด เพื่อให้ได้ปริมาตรเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลวทั้งหมดที่บรรจุอยู่ในถังหมัก (Fermentation Equipment, model MD-500, 10 L. Marubishi Laboratory Co., Ltd., Japan) ขนาด 10 ลิตร แล้วนำไปถ่ายลงในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ ซึ่งมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 1.2 ปริมาตร 4 ลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 30 นาที กวนด้วยใบพัดความเร็ว 400 รอบ/นาที ความดันอากาศ

3.5 กก. ต่อตารางเซนติเมตร และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง และใช้อะเดคานอลเจือจาง 1 : 5 เท่า (Adecanol) ประมาณ 5 มิลลิลิตร เป็นสารยับยั้งการเกิดฟอง (antifoam) หลังจากนั้นเก็บเซลที่ได้โดยนำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (Sorval RC. -5B, Du Pont Instruments) ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดแยกเอนไซม์ต่อไป

2. <u>การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส</u>

โดยการวัดปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคส โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวด้วยวิธีการของ Marshall และ Kooi (8) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Dische และ Borenfreund (70) วิธีการคือนำสารละลายเอนไซม์ซึ่งสกัดแยกจากเซลด้วยวิธีการซึ่งจะได้กล่าวต่อไปในข้อ 5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มในส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ซึ่งประกอบด้วย 0.6 มิลลิลิตรของ 1.0 โมลาร์ กลูโคส, 0.2 มิลลิลิตรของ 0.5 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, 0.1 มิลลิลิตรของ 0.1 โมลาร์ $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 มิลลิลิตรของ 0.01 โมลาร์ $CoCl_2.6H_2O$ และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตร นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายตัวอย่างที่เวลา 1 นาที และทุก ๆ 10 นาทีเป็นเวลา 30 นาที นำมาเจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นจึงนำไปหาปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสที่เกิดขึ้นโดยวิธี cysteine carbazole (70) และเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลฟรุคโตสมาตรฐานจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุคโตสซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (unit) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุคโตส 1 ไมโครโมล (μmole) ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะของวิธีการตรวจสอบเอนไซม์ดังกล่าวมาข้างต้น

3. <u>การเตรียมกราฟมาตรฐาน</u> (Standard curve) ของน้ำตาลฟรุคโตส

การหาปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสโดยวิธีการของ Marshall และ Kooi ทำดังนี้คือ นำ 1 มิลลิลิตรของน้ำตาลฟรุคโตสที่มีความเข้มข้น 2, 6, 10, 16, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรเพื่อใช้เป็นตัวเทียบ (blank) มาเติม 0.2

มิลลิลิตรของ 1.5 เปอร์เซนต์ของ Cysteine HCl และ 6.0 มิลลิลิตรของ 70 เปอร์เซนต์ สารละลายกรดซัลฟูริคเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 0.2 มิลลิลิตรของ 0.12 เปอร์เซนต์ Alcoholic Carbazole ลงไปทันที เขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง (ice bath) ทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสักครู่ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD.) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Double beam spectrophotometer, รุ่น 210-5763, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (nm)

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสและค่าการดูดกลืนแสง

4. <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u>

4.1 <u>การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของลอว์รี</u> (Lowry et.al.) (71)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 1.0 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรซึ่งใช้เป็นตัวเทียบมาเติม 5.0 มิลลิลิตรของสารละลายผสมลอว์รี ซี (Lowry C.) (ภาคผนวกที่ 6.1.3) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ (ภาคผนวกที่ 6.1.4) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีโดยเขย่าเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และหาค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานของอัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม

4.2 <u>การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด</u> (Bradford, M.) (72)

การหาปริมาณโปรตีนวิธีนี้อาศัยหลักของการที่โปรตีนจะจับกับสี (protein dye binding) โดยสีที่ใช้คือ โคแมสซี บลู (Coomassie blue G-250) ซึ่งสามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนที่มีปริมาณน้อยได้อย่างรวดเร็ว

ขั้นตอนการดำเนินการทำดังนี้คือ นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตรซึ่งใช้เป็นตัวเทียบมาเติม 5 มิลลิลิตรของสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ (ภาคผนวกที่ 6.2.1) เขย่าให้เข้ากันดี และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และหาปริมาณ

โปรตีนในสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบค่าการดูดแสงกับสารละลายมาตรฐานของอัลบูมิน ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัม

5. การสกัดแยกเอนไซม์จากเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1

5.1 การศึกษาวิธีการที่ใช้ในการสกัดแยกเอนไซม์จากเซล

5.1.1 เปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์ระหว่างวิธีกล (mechanical disruption) และวิธีการใช้สารเคมี (chemical disruption)

วิธีการสกัดแยกเอนไซม์จากเซลทั้ง 2 วิธีนี้ ได้ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีการของ Chen และคณะ (35) และ Takasaki และคณะ (36) โดยที่การสกัดแยกโดยวิธีกลด้วยการบด (abrasive grinding) กับผงอะลูมินาละเอียด และการสกัดแยกโดยใช้สารเคมี ด้วยสารเคมีต่าง ๆ ดังนี้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (Cetyltrimethyl ammonium bromide), 1.0 เปอร์เซ็นต์ทอลูอีน (Toluene) และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ทวีน 80 (Tween 80) ซึ่งละลายอยู่ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

5.1.1.1 การสกัดแยกเอนไซม์โดยการบด

นำเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ประมาณ 1.5 กรัม มาบดกับ 2 กรัม ของผงอะลูมินาละเอียด (fine alumina powder) แล้วนำไปสกัดแยกเอนไซม์ด้วย 5.0 มิลลิลิตรของ 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 หลังจากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสไว้ใช้เป็นเอนไซม์เริ่มต้น (crude enzyme) วัดปริมาตร, ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

5.1.1.2 การสกัดแยกเอนไซม์ด้วยสารเคมี

วิธีการสกัดแยกกลูโคสไอโซเมอเรสด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Chen และคณะ (35) และ Takasaki และคณะ (36) โดยนำเซลมาส่วนละ 1.5 กรัม แช่ใน 5.0 มิลลิลิตรของสารละลายต่อไปนี้ 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ของเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 1.0 เปอร์เซ็นต์ทอลูอีน หรือ 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ทวีน-80 แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกเซลออกโดยนำ

มาปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาวัดปริมาตร, ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

6. การเตรียมคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE Cellulose)

แช่ดีอีเออี-เซลลูโลสประมาณ 5 กรัมในน้ำ 500 มล. ปล่อยให้พองตัวเต็มที่แล้วกำจัดส่วนที่เป็นผงละเอียด (fine particle) ออกโดยค่อย ๆ เทชั้นน้ำทิ้ง ต่อจากนั้นนำมาแช่ใน 0.1 นอร์มอลของกรดเกลือที่มีปริมาตรมากเกินพอ พร้อมทั้งกวนเป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งจนกระทั่งส่วนน้ำใสมี pH เป็น 4 จึงนำมาปรับ pH ให้เป็นกลางโดยใช้ 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งจนได้ pH เป็น 7 หลังจากนี้จึงนำมาแช่ใน 0.1 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วจึงแช่ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ดีอีเออี-เซลลูโลสอยู่ในสภาพสมดุลย์ในบัฟเฟอร์ที่จะใช้ต่อไป

บรรจุ ดีอีเออี-เซลลูโลสที่เตรียมได้นี้ลงในคอลัมน์ขนาด 2.5 x 50 ซม. เพื่อให้ได้ความสูง 40 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ลงในคอลัมน์ซ้ำ ๆ อย่างน้อย 2 เท่าของปริมาตรดีอีเออี-เซลลูโลสในคอลัมน์ วัด pH ของสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์เพื่อให้แน่ใจว่ามี pH เป็น 7

7. การเตรียมคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50)

นำดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ประมาณ 3 กรัมแช่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์-โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ 500 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อปล่อยให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ หลังจากนั้นเทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นจึงนำเจลที่ได้นี้มาบรรจุลงในคอลัมน์แก้ว (ขนาด 1.5 x 60 ซม.) ให้ได้ความสูงประมาณ 50 ซม. ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์-โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ ลงในคอลัมน์อย่างน้อย 2-3 เท่าของปริมาตรเจลเพื่อให้คอลัมน์นี้อยู่ในสภาพสมดุลย์ วัด pH ของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์

8. การเตรียมคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200 (Sephadex G-200)

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-200 ประมาณ 5 กรัมในสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ปริมาณมากเกินพอในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเม็ดเจลที่พองตัวเต็มที่แล้วนี้บรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.0 x 40 ซม. ให้ได้เจลสูงประมาณ 31 ซม. ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ลงในคอลัมน์ประมาณ 2 เท่าของปริมาตรเจลด้วยอัตราการไหลประมาณ 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แรงดันสารละลาย 12 เซนติเมตรของน้ำ เพื่อให้เม็ดเจลอยู่ในสภาพสมดุลย์ในคอลัมน์ หลังจากนั้นตรวจสอบความสม่ำเสมอของการบรรจุคอลัมน์ด้วยการผ่านสารละลายบลูเดกซ์แทรน 4 มก./มล. ลงในคอลัมน์ พร้อมทั้งวัดปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ (void volume)

9. การทำอีเลกโตรโฟรีซีส

9.1 การทำโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลกโตรโฟรีซีสชนิดแท่ง (Disc. polyacrylamide gel electrophoresis)

การทำอีเลกโตรโฟรีซีสบนโพลีอะไครลาไมด์เจลนี้ใช้วิธีการของ Williams และ Reisfeld (74) โดยบรรจุสารละลายผสม 7 เปอร์เซ็นต์เซพาเรติงเจล (separating gel) ซึ่งเตรียมดังที่กล่าวไว้ในภาคผนวกข้อ 7.1.8) ลงในหลอดแก้วขนาด 0.5 x 8.0 เซนติเมตร ให้มีความสูง 7 เซนติเมตร หลังจากที่เจลแข็งตัวแล้ว เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (stacking gel) ซึ่งเตรียมดังกล่าวไว้ในภาคผนวกข้อ 7.1.9 ให้มีความสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ภายใต้แสงจนกระทั่งเจลแข็งตัว ต่อจากนั้นนำ 100 ไมโครลิตรของสารละลายซึ่งประกอบด้วย 50 ไมโครลิตรของโปรตีนที่จะทดสอบ (ปริมาณโปรตีน 50-100 ไมโครกรัม) 40 ไมโครลิตรของกลีเซอรอล และ 10 ไมโครลิตรของ 0.005 เปอร์เซ็นต์บรอมฟีนอลบลู มาทำอีเลกโตรโฟรีซีสบนแท่งเจลนี้ โดยใช้สารละลายทริสไกลซีน pH 9.5 (ภาคผนวกที่ 7.1.7) เป็นบัฟเฟอร์โดยใช้เครื่องอีเลกโตรโฟรีซีส (HSI disc electrophoresis chamber, Model DE 102, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, U.S.A. และ Shandon power supply, Model Vokam 2541, Shandon Scientific Co., Ltd., England) ผ่านกระแสไฟฟ้า 7.0 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจล เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หลัง

จากนั้นนำแท่งเจลมาแช่ในสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์กรดอะซีติก แล้วจึงย้อมสีในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining Solution) ซึ่งประกอบด้วย 0.23 เปอร์เซ็นต์สีโคแมสซี บริลเลียนท์บลู จี-250 ในสารละลายผสม 10 เปอร์เซ็นต์กรดอะซีติก และ 49 เปอร์เซ็นต์เมทานอล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกโดยการทำอีเลกโตรโฟรีซีสในสารละลาย 7.5 เปอร์เซ็นต์กรดอะซีติกและ 5 เปอร์เซ็นต์เมทิลแอลกอฮอล์นาน 2 ชั่วโมง สำหรับการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในแท่งเจล ทำโดยนำแท่งเจลที่ผ่านการทำอีเลกโตรโฟรีซีสแต่ไม่ได้ย้อมสีมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยเปรียบเทียบกับแท่งเจลที่ผ่านการย้อมสี แล้วชะโปรตีนออกมาโดยนำมาแช่ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) 1 คืน แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ดังวิธีการในข้อ 2

9.2 <u>การทำอีเลกโตรโฟรีซีสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u>

การทำอีเลกโตรโฟรีซีสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะไครลาไมด์เจล ใช้วิธีของ Laemmli (74) โดยใช้อุปกรณ์การเตรียมเจลแผ่น (slab gel) และการทำอีเลกโตรโฟรีซีสของบริษัท LKB Model 2001. Vertical Electrophoresis

ขั้นตอนดำเนินการทำดังนี้ ประกบแผ่นแก้วขนาด 16 x 18 เซนติเมตร 2 แผ่นเข้าด้วยกันบนเครื่องเตรียมเจลแผ่นโดยสอดแผ่นพลาสติก (spacers) หนา 0.75 มิลลิเมตรที่ขอบด้านข้างทั้ง 2 ข้าง เทสารละลายผสมของรีโซลวิ่งเจลซึ่งให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเจลเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในภาคผนวกข้อ 8.7) ลงไปในแผ่นแก้วให้ได้ความสูง 12 เซนติเมตร หยดน้ำลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาทีจนกระทั่งเจลแข็งตัว เทน้ำออกแล้ววางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงในระหว่างแผ่นแก้วทั้ง 2 เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (องค์ประกอบแสดงในภาคผนวกข้อ 8.8) เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงแผ่นพลาสติกดังกล่าวออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลกโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวกที่ 8.1) 2-3 ครั้ง แล้วเติมอีเลกโทรดบัฟเฟอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์ และโปรตีนมาตรฐาน 3 ชนิดคือ ไซโตโครม ซี (Cytochrome C.), ไคโมทริปซิโนเจน (Chymotrypsinogen) และโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Borine serum albumin) เข้มข้นอย่างละ 15 ไมโครกรัม ละลายใน 50 ไมโครลิตรของบัฟเฟอร์ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในภาคผนวกข้อ 8.4 และต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำมาใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล โดยใช้แฮมิลตันไซริงจ์ (Hamilton syringe) ทำการ

อีเลกโตรโฟรีซีส์ที่ 60 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงครึ่ง ต่อจากนั้นนำแผ่นเจลนี้มาแช่ใน สารละลายผสมของ 10 เปอร์เซนต์กรดอะซีติก และ 45 เปอร์เซนต์เมทานอลค้างคืน ย้อมสี ด้วยสารละลาย 0.04 เปอร์เซนต์โคแมสซี บลู จี-250 ในสารละลายผสมของ 10 เปอร์เซนต์ กรดอะซีติก และ 45 เปอร์เซนต์เมทานอล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชะล้างสีด้วยสารละลายผสมของ 10 เปอร์เซนต์กรดอะซีติก และ 45 เปอร์เซนต์เมทานอล

10. <u>การศึกษาชนิดของเกลือแร่ที่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์</u>

นำเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมากำจัดเกลือแร่ที่อาจปะปนมา โดยบรรจุในถุงไดอะไลส์ (dialysing bag) และแช่ใน 0.01 โมลาร์ EDTA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปแช่ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ก่อนที่จะนำ ไปบ่มในส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 0.3 มล. ของ 1.0 โมลาร์โซเดียมฟอส์เฟต-บัฟเฟอร์ pH 7.0 0.6 มิลลิลิตรของ 1.0 โมลาร์ ดี-กลูโคส์, 0.5 มล. ของน้ำกลั่น และ เกลือแร่ต่าง ๆ ที่จะทดสอบที่ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ ดังนี้ $MgSO_4 . 7H_2O$, $CoCl_2 . 6H_2O$, $MnSO_4 . 4H_2O$, $CaCl_2 . 2H_2O$, $ZnSO_4 . 7H_2O$, $BaCl_2 . 2H_2O$, $CuSO_4 . 5H_2O$, $FeSO_4 . 7H_2O$, $Fe_2(SO_4)_3$, $HgCl_2$, AgCl หรือ $MgSO_4 . 7H_2O$ ผสมกับ $CoCl_2 . 6H_2O$ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2 ของบทนี้