บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ก๊าซ

ไนโตรเจนและอาร์กอน ของบริษัท ไทยอินดัสเตรียลก๊าซ จำกัด

อะเซทิลีน ของบริษัท สิทธิโชคเอนจิเนียริ่ง จำกัด

เอทิลีนมาตรฐาน ของ SUPELCO

1.2 เคมีภัณฑ์

1.2.1 เคมีภัณฑ์สำหรับการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส

ซัลฟานิลามีด ของ Fluka A.G., Buchs S.G. Switzerland

N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride ของ Fluka A.G., Buchs S.G. Switzerland

1.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนส ฟอร์ม N

PMS ของ BDH Chemicals Ltd., England

DCPI ของ RIEDEL-DE HAEN AG SEELZE-HANNOVER

1.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการหาปริมาณไนเตรต

กรดซัลฟามิก ของ BDH Chemicals Ltd., England

กรดเปอร์คลอริก ของ AJAX Chemicals Ltd., Australia

1.2.4 ตัวให้อิเลคตรอนสำหรับการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส

β-NADH No.N-8129 ของ Sigma Chemicals Co., U.S.A.

เมทธิลไวโอโลเจน ของ BDH Chemicals Ltd., England

เบนซิลไวโอโลเจน ของ BDH Chemicals Ltd., England

โซเดียมฟอร์มเมต ของ May & Baker Ltd., England

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โซเดียมซัคซิเนต ของ BDH Chemicals Ltd., England

โซเดียมไดโธโอไนต์ ของ May & Baker Ltd., England

1.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เอทีพีเอส

ATP ของ Sigma Chemicals Co., U.S.A.

1.3 แบคทีเรีย

เชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 จากกองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 เมล็ดถั่ว

เมล็ดถั่วเหลือง สายพันธุ์ สจ.5 จากกองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอล (Yeast Mannitol Broth) (Vincent, J.M., 1970) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม (rich medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

แมนนิทอล	10.0	กรัม
โปตัสเซียมฟอสเฟต (โมโนเบสิก)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.1	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	0.5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้ออบความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์แมนนิทอลสำหรับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไมโครแอโรบิก ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอล ตามสูตรในข้อ 2.1	1	ลิตร
วุ้น (Bacto-Agar)	15	กรัม
สารละลายคองโกเรด ร้อยละ 0.25	10	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล แล้วจึงเติมวุ้นและ

สารละลายกลองโกเรด ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้ออบความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารที่ใช้ปลูกต้นถั่วเหลือง (Broughton และ Dilworth, 1970)

สารละลาย 1	ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย	
	แคลเซียมคลอไรด์	294.1 กรัม
สารละลาย 2	ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย	
	โปตัสเซียมฟอสเฟต (ไดเบสิก)	136.0 กรัม
สารละลาย 3	ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย	
	เฟอริกซิเตรต	6.7 กรัม
	แมกนีเซียมซัลเฟต	123.3 กรัม
	โปตัสเซียมซัลเฟต	8.7 กรัม
	แมงกานีสซัลเฟต	0.338 กรัม
สารละลาย 4	ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย	
	กรดบอริก	0.247 กรัม
	ซิงค์ซัลเฟต	0.288 กรัม
	คอปเปอร์ซัลเฟต	0.1 กรัม
	โคบอลท์คลอไรด์	0.056 กรัม
	โซเดียมโมลิบเดต	0.048 กรัม

ในสูตรอาหาร 10 ลิตร ประกอบด้วยสารละลาย 1 ถึง 4 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ทำให้เป็น 10 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อด้วยหม้ออบความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

กรณีเหนี่ยวนำด้วยไนเตรต เติมโปตัสเซียมไนเตรตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 และ 6 มิลลิโมลาร์ ตามต้องการ

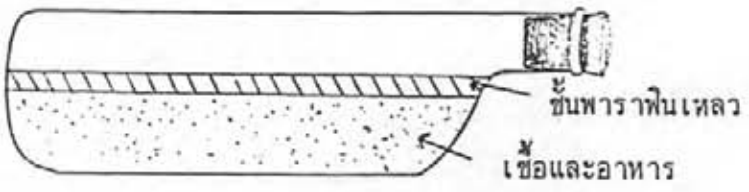
4. การเลี้ยงเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122

4.1 การเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี จากจานทดลองลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอล จำนวน 150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ที่มีขนาดความจุ 500 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 28 °ซ ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ในเครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ (shaking water bath) วัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 จากนั้นแบ่งเชื้อตั้งต้นปริมาตร 12 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอล จำนวน 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ที่มีขนาดความจุ 1,000 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 5-6 วัน (ระยะ stationary phase) ความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร จะมีค่าประมาณ 1.2 จึงเก็บเชื้อมาเพื่อศึกษาไนเตรตรีดัคเทสต่อไป

4.2 การเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะไมโครแอโรบิก

เตรียมเชื้อตั้งต้นเช่นเดียวกับข้อ 4.1 แบ่งเชื้อตั้งต้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์แมนนิทอลสำหรับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไมโครแอโรบิก จำนวน 300 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวด Ruk Flask ที่มีขนาดความจุ 500 มิลลิลิตร ตามลักษณะในรูปที่ 2 ป้องกันออกซิเจนสัมผัสกับเชื้อและอาหารด้วยการใช้พาราฟินเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปกคลุมผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อหนาประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 7 วัน (ถึงระยะ stationary phase) ความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร จะมีค่าประมาณ 0.5 จึงเก็บเซลล์นี้เพื่อศึกษาไนเตรตรีดัคเทสต่อไป



รูปที่ 2 Rux Flask

5. การเตรียมเซลล์และสารละลายเอนไซม์

5.1 เซลล์แขวนลอย

เก็บแล้วล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 100 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้งด้วยอัตราส่วนเซลล์ต่อปริมาตรบัฟเฟอร์เท่ากับ 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร โดยปั่นที่ความถี่ 6,000xg เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่องปั่นแรงสูงของ Beckman Model J-21C แล้วกระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อเซลล์ 0.02 กรัม นำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อไป

5.2 สารละลายเอนไซม์

เก็บแล้วล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 100 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ด้วยอัตราส่วนเซลล์ต่อปริมาตรบัฟเฟอร์เท่ากับ 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร โดยปั่นที่ความถี่ 6,000xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วกระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อเซลล์ 0.1 กรัม นำไปใส่ในเครื่อง French Pressure Cell Press ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพิ่มความกดดันเข้าเครื่อง French Pressure Cell ที่ความดัน 17,400 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทำให้เซลล์แตกด้วยความดันสูงนี้ โดยการปล่อยสารละลายเซลล์เข้าสู่ความดันปกติ ด้วยความเร็ว 20 หยดต่อนาที รองรับสารละลายโฮโมจิเนตด้วยหลอดเซนตริฟิวส์ของ Beckman ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็งและอยู่ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน นำไปปั่นที่ความถี่ 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องปั่นแรงสูงของ Beckman model J-21C แยกส่วนของเหลวไปปั่นที่ความถี่ 100,000xg เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่องปั่นอุลตร้าเซนติริฟิวส์ของ Beckman model L8-70 จะได้ส่วนใส (soluble fraction) และส่วนตะกอน (pellet fraction) ซึ่งเป็นส่วนเยื่อเซลล์ (membrane fraction) นำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อไป

6. การปลูกต้นถั่วเหลืองและการตัดปมราก

6.1 การเลี้ยงเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122

เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ดังอธิบายแล้วในข้อ 4.1

6.2 การเพาะเมล็ดถั่วเหลือง

เลือกเมล็ดถั่วเหลือง สายพันธุ์ สจ.5 ที่มีลักษณะสมบูรณ์ มาทำการฆ่าเชื้อโดยแช่ในน้ำยาคลอร็อกซ์ (Chlorox) ร้อยละ 3 เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น

ที่ปลอดเชื้อ ประมาณ 10 ครั้ง คัดเลือกเมล็ดที่มีลักษณะเปลือกเมล็ดย่นแต่ไม่แตก (แสดงว่าเปลือกเมล็ดอ่อนนุ่มพร้อมที่จะงอกแล้ว) นำมาแช่ในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อประมาณ 8 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเพาะบนสำลีฆ่าเชื้อที่ชุ่มด้วยน้ำในจานเลี้ยงเชื้อ วางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมล็ดจะงอกรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร สามารถนำไปเพาะบนทรายได้

6.3 การเตรียมลีโอนาร์ดจาร์ (Leonard jar) (ดัดแปลงจาก Vincent, J.M., 1970)

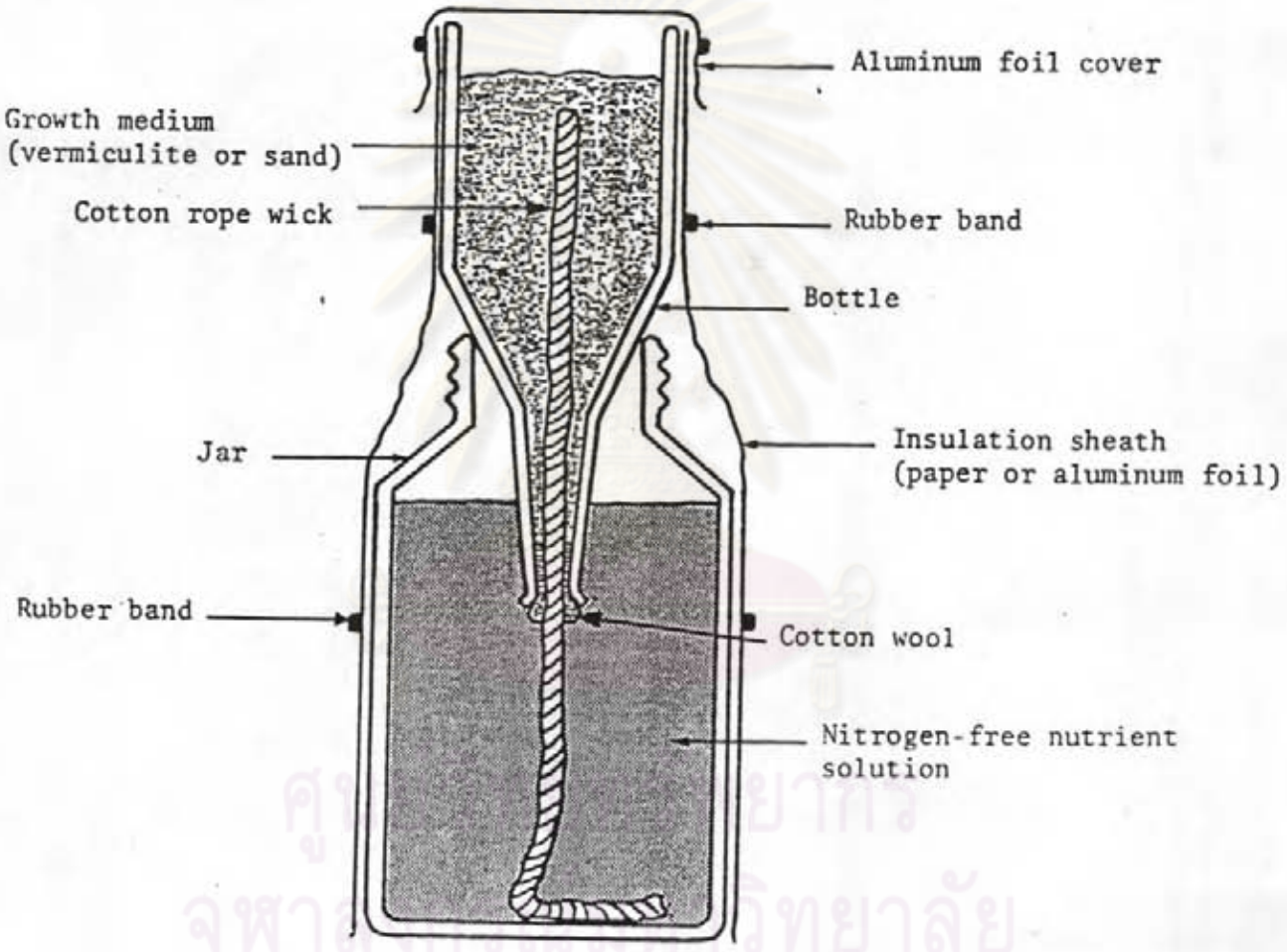
6.3.1 การเตรียมทราย นำทรายมาล้างให้สะอาดจนน้ำที่ล้างใส (ประมาณ 10 ครั้ง) แล้วแช่ทรายในน้ำต้มเดือดแล้ว 2 ครั้ง ๆ ละ 4 ชั่วโมง นำทรายไปอบให้แห้ง

6.3.2 การเตรียมลีโอนาร์ดจาร์ ลีโอนาร์ดจาร์ประกอบด้วยขวดเบียร์ 2 ใบ ใบแรกตัดก้นขวดออก นำสำลีกับเชือกฟอกสอดเข้าไปในปากขวดให้ปลายเชือกห้อยออกมายาวพอที่จะถึงก้นของขวดใบที่สองซึ่งตัดปากขวดออก นำทรายใส่ลงในขวดใบแรกจนเต็ม แล้ววางขวดใบแรกบนขวดใบที่สอง ตามลักษณะในรูปที่ 3 ห่อด้วยกระดาษให้มิดชิด นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้ออบความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาอบในตู้อบความร้อนให้แห้งสนิท

6.3.3 การปลูกถั่วและการสร้างปมราก นำอาหารที่ใช้ปลูกถั่วเติมลงในขวดใบแรกของลีโอนาร์ดจาร์ให้ทรายชุ่ม แล้วจึงเติมในขวดใบที่สองของลีโอนาร์ดจาร์ประมาณ 3/4 ของขวด ขุดหลุมในทรายลึกประมาณ 1 นิ้ว ขวดละ 3 หลุม นำเมล็ดที่เพาะไว้แล้วใส่ลงไปหลุมละ 1 เมล็ด หยอดเชื้อไรโซเบียมลงบริเวณที่ฝังเมล็ดหลุมละ 1 มิลลิลิตร กลบหลุมด้วยทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปตั้งไว้ใน Light Room (อุณหภูมิ 25 °ซ และแสง 12,000 Luxs) เป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อต้นถั่วงอก ถอนต้นที่ไม่สมบูรณ์ออก เหลือต้นที่สมบูรณ์ที่สุด 1 ต้นต่อ 1 ขวดลีโอนาร์ดจาร์ นำไปตั้งไว้ใน Green House เติมอาหารที่ใช้ปลูกต้นถั่วอาทิตย์ละ 2 ครั้ง เพื่อให้ทรายชุ่มชื้นอยู่เสมอ ทำการเก็บต้นถั่ววันที่ 40 ของการปลูก

6.3.4 การเหนี่ยวนำไนเตรตรีดัคเทสในต้นถั่วด้วยไนเตรต ในต้นถั่วที่ต้องการเหนี่ยวนำให้เกิดเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส เปลี่ยนอาหารที่ใช้ปลูกต้นถั่วเป็นชนิดที่มีโปตัสเซียมไนเตรต ในวันที่ 14 ของการปลูก จนกระทั่งเก็บต้นถั่วเมื่ออายุ 40 วัน

014419



รูปที่ 3 ลีโอนาร์ด จาร์

7. การเตรียมแบคทีรอยด์จากปมราก (Neyra และ Stephens, 1983)

เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน โดยนำส่วนรากของต้นถั่วเหลืองมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง ตัดปมรากของถั่วเหลืองออกจากรากแล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้ออีกครั้งหนึ่ง ซับให้แห้ง นำไปชั่งน้ำหนักปม บดปมรากด้วยโกร่งโดยใช้อัตราส่วนปมราก 1 กรัมต่อโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 100 มิลลิโมลาร์ ที่มีโพลีไวนิลไพริโดนร้อยละ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่านผ้าก๊อซหนา 4 ชั้น แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปปั่นที่ความถี่ 500xg เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นแรงสูงของ Beckman model J-21C แยกส่วนใสเก็บไว้ นำส่วนตะกอนมาบดอีกครั้งเช่นเดียวกับข้างต้น นำสารละลายที่ได้ไปปั่นที่ความถี่ 500xg เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสไปรวมกับครั้งแรก นำส่วนใสทั้งหมดไปปั่นที่ความถี่ 6,000xg เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของพืช (plant cytosol fraction) และส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนของแบคทีรอยด์ (bacteroid fraction) ล้างส่วนตะกอนด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 20 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง แล้วกระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์นี้จำนวน 1 มิลลิลิตร ตรวจสอบการแยกส่วนของแบคทีรอยด์ออกจากส่วนของพืชโดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อไป

8. การแยกส่วนประกอบของเซลล์ (ปรับปรุงจาก Kennedy และคณะ, 1975)

โดยการใช้เทคนิค differential centrifugation ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ซึ่งจะสามารถแยกส่วนประกอบของเซลล์เป็นส่วนต่าง ๆ ดังแผนภาพต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เก็บส่วนต่าง ๆ มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสและเอทีพีเอส เพื่อดูว่าเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสอยู่ที่ส่วนใดของเซลล์

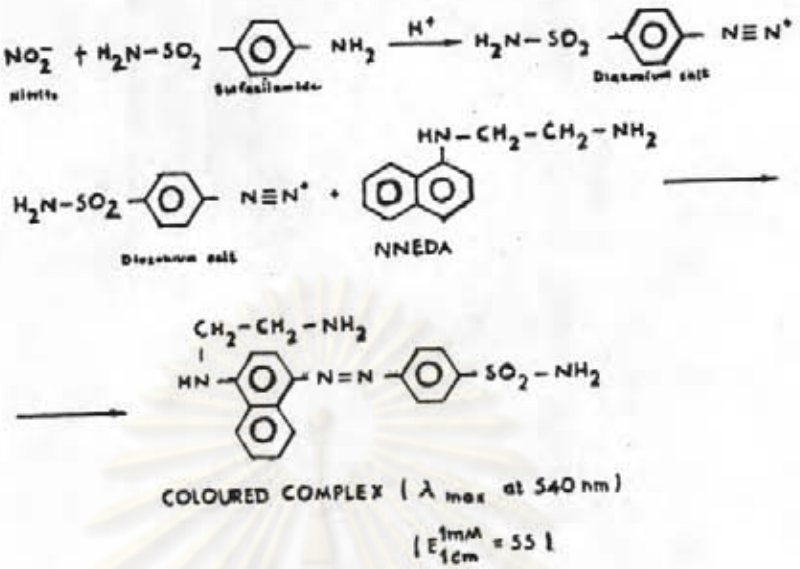
9. การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์

9.1 การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในโตรจิเนส (ลิขิตลิลิต, 1981)

ใช้วิธีการวัดอะเซทิลีนรีดักชั่น โดยนำตัวอย่างพืชที่ส่วนรากมาล้างน้ำให้สะอาด ซับให้แห้งใส่ลงในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ที่มีขนาดความจุ 50 มิลลิลิตรขวดละ 2 ต้น ปิดด้วยจุกยาง หุ้มจุกยางด้วยพาราฟิล์ม นำไปเปลี่ยนบรรยากาศเป็นก๊าซอาร์กอนโดยใช้เครื่องดูดอากาศ ดูดอากาศออกและบรรจุก๊าซอาร์กอนเข้าไปแทนที่ (ทำซ้ำ 3-4 ครั้ง) ดูดอาร์กอนออกร้อยละ 10 ของปริมาตร แล้วบรรจุก๊าซอะเซทิลีนด้วยปริมาตรเท่ากันเข้าไปแทนที่ จากนั้นดูดก๊าซผสม (อาร์กอนและอะเซทิลีน) ออกร้อยละ 20 ของปริมาตร บรรจุก๊าซออกซิเจนเข้าไปแทนที่ด้วยปริมาตรเท่ากัน อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 30 °ซ 1 ชั่วโมง วัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการรีดิวส์อะเซทิลีนโดยเอนไซม์ในโตรจิเนส โดยใช้ขนาดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเอทิลีนมาตรฐาน วัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟที่มี detector ชนิด Flame Ionization คอลัมน์ Porapak N ขนาด 2.0 m x $\frac{1}{8}$" โดยใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซพา (carrier gas) ด้วยความเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 90 °ซ จากนั้นนำตัวอย่างพืชมานับจำนวนปมและชั่งน้ำหนักปม แอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชั่นแสดงค่าเป็นนาโนโมลของเอทิลีนที่เกิดขึ้นต่อชั่วโมงต่อกรัมน้ำหนักปม

9.2 การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ใช้โซเดียมซัคซิเนตเป็นตัวให้อิเลคตรอนแก่เอนไซม์ในเตรตรีดักเทส ในการเปลี่ยนอนุมูลไนเตรตของโปตัสเซียมไนเตรต ซึ่งเป็นสารตั้งต้นให้เป็นไนไตรต์ วัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ซัลฟานิลามีด ทำปฏิกิริยากับไนไตรต์ เกิดเป็นเกลือไดอะโซเนียม ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride เกิดเป็น Azo dye สีแดง ซึ่งสามารถวัดปริมาณที่เกิดขึ้นได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาของการวัดปริมาณไนเตรต์

9.2.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในสารละลายเอนไซม์ (ปรับปรุงจาก CHI-YING HUANG, 1982)

สารทำปฏิกิริยาประกอบด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 100 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมไนเตรต 7.5 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซัคซิเนต 12.5 มิลลิโมลาร์ บรรจุในหลอดทดลอง ปิดด้วยจุกยาง หุ้มจุกยางด้วยพาราฟิล์ม เปลี่ยนบรรยากาศเป็นก๊าซอาร์กอน ใช้เข็มฉีดยาขนาด 20G x 3½" เติมสารละลายเอนไซม์จำนวน 0.325 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายสำหรับวัดปริมาณไนไตรต์ คือ สารละลายซัลฟานิลามีดร้อยละ 1 จำนวน 0.125 มิลลิลิตร และสารละลาย N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride ร้อยละ 0.02 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (Nicholas และ Nason, 1957) อินคิวเบตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที ตกตะกอนสิ่งที่อาจรบกวนการวัดการดูดกลืนแสงได้โดยปั่นที่ความถี่ 12,000xg เป็นเวลา 4 นาที ด้วยเครื่องปั่นขนาดเล็กของ Sigma model Sigma 2MK แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectronic 2000 ในทุกการทดลอง ได้ทำการวัดการดูดกลืนแสงเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดจาก endogenous substrate ด้วยทุกครั้ง โดยการใส่สารละลายทุกตัวดังกล่าวแล้วลงในหลอดทดลอง ยกเว้นโปตัสเซียมไนเตรต

ค่าที่ได้จะนำไปหักออกจากปฏิกิริยาอันเนื่องมาจากไนเตรตที่ใส่ลงไป แอคติวิตีจำเพาะของปฏิกิริยาแสดงค่าเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน กำหนดให้เอนไซม์ 1 หน่วย คือปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไนไตรต์ 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

9.2.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในเซลล์แขวนลอย (Gallop R. และ Y.J. Avissar, 1984)

สารทำปฏิกิริยาประกอบด้วย เซลล์แขวนลอย ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 1-3 มิลลิกรัม โปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซัคซิเนต 12.5 มิลลิโมลาร์ อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ความถี่ 12,000xg เป็นเวลา 4 นาที ด้วยเครื่องปั่นขนาดเล็กของ Sigma model Sigma 2MK นำส่วนใสมาวัดปริมาณไนไตรต์ โดยการเติมสารละลายสำหรับวัดปริมาณไนไตรต์ เช่นเดียวกับข้อ 9.2.1 วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectronic 2000

9.3 การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N (Lester และ De Moss, 1971)

โดยการใช้ฟีนาซีนเมทโธซัลเฟต (Phenazine methosulfate) ซึ่งเป็นตัวรับอิเลคตรอนสังเคราะห์ รับอิเลคตรอนจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N ในการเปลี่ยนฟอร์มเมตให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อิเลคตรอนและโปรตอน แล้วฟีนาซีน-เมทโธซัลเฟต จะให้อิเลคตรอนแก่ DCPI (2,6-dichlorophenol indophenol) ทำให้ DCPI เปลี่ยนเป็นรีดิวส์ฟอร์ม ปฏิกิริยานี้จะวัดออกซิไดส์ฟอร์มของ DCPI ที่ลดลง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

$$\text{Formate} + \text{PMS}_{\text{oxidized}} \xrightarrow{\text{FDH}_N} CO_2 + 2H^+ + \text{PMS}_{\text{reduced}} \longrightarrow \begin{cases} \text{DCPI}_{\text{oxidized (color)}} \\ \text{DCPI}_{\text{reduced (colorless)}} \end{cases}$$

สารทำปฏิกิริยา จำนวน 4.2 มิลลิลิตร ประกอบด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 100 มิลลิโมลาร์ DCPI 0.078 มิลลิโมลาร์ ฟีนาซีนเมทโธซัลเฟต 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมกันในปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลอง ปิดด้วยจุกยาง หุ้มจุกยางด้วย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พาราฟิล์ม เปลี่ยนบรรยากาศเป็นก๊าซอาร์กอน เติม เซลล์แขวนลอย ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ 1 มก.โปรตีน/มล. จำนวน 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด $20\times3\frac{1}{2}$" วัด endogenous rate เป็นเวลา 1-2 นาที แล้ววัดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมฟอร์มเมต ซึ่งเป็นสารตั้งต้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.18 มิลลิโมลาร์ วัดอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง spectronic 20 ซึ่งต่อกับเครื่องบันทึกการดูดกลืนแสง ISCO medel 613 ค่า extinction coefficient ของ DCPI มีค่าเท่ากับ 21 มิลลิโมลาร์$^{-1}$.เซนติเมตร$^{-1}$ แอคติวิตีจำเพาะของปฏิกิริยา แสดงค่าเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน กำหนดให้ 1 หน่วย (unit) คือจำนวนออกซิไดส์ฟอร์มของ DCPI ที่ลดลง 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

9.4 <u>การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เอทีพีเอส</u> (Thipayathasana, 1975)

โดยการใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ช่วยทำลายผนังเซลล์ให้เป็นช่อง เพื่อให้ ATP สามารถเข้าไปในเซลล์ได้ดีขึ้น และเอนไซม์เอทีพีเอส ซึ่งอยู่ที่ส่วนเยื่อเซลล์ (membrane fraction) ภายในเซลล์ จะใช้ ATPทำให้เกิดอนุมูลอนินทรีย์ฟอสเฟต ซึ่งจะถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ วัดปริมาณอนุมูลอนินทรีย์ฟอสเฟตที่เกิดขึ้น โดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

สารทำปฏิกิริยา เรียกว่า สารละลายไลโซไซม์ จำนวน 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย Tris-HCL บัฟเฟอร์ pH 6.8, 0.1 มิลลิโมลาร์ ไลโซไซม์ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซูโครสร้อยละ 20 EDTA 1 มิลลิโมลาร์ เติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 0-250 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 15 นาที กรองทันทีด้วย millipore filters ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน จะได้เซลล์อยู่บนกระดาษกรอง ล้างเซลล์ที่อยู่บนกระดาษกรองด้วย Tris-HCL บัฟเฟอร์ pH 6.8, 10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่นั้นไปใส่ในหลอดทดลองที่มีสารทำปฏิกิริยาเอทีพีเอสอยู่จำนวน 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย ATP 7.5 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ Tris-HCL บัฟเฟอร์ pH 9.0, 50 มิลลิโมลาร์ นำไปอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม TCA ร้อยละ 25 จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความถี่สูงสุดของเครื่องปั่นความเร็วต่ำ ของ International Equipment เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน นำส่วนใสมาทำการวัดปริมาณอนินทรีย์ฟอสเฟตที่เกิดขึ้น โดยใช้ส่วนใสจำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับ

สารละลายเหล็กจำนวน 3.5 มิลลิลิตร (เฟอรัสซัลเฟตร้อยละ 0.8 ในกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 18.75 มิลลิโมลาร์) และสารละลายโมลิบเดตจำนวน 0.3 มิลลิลิตร (แอมโมเนียมโมลิบเดต ร้อยละ 6.6 ในกรดซัลฟูริก 7.5 โมลาร์) เขย่าอย่างแรง วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง spectronic 20 ปริมาณอนินทรีย์ฟอสเฟตคำนวณได้จากการใช้โปตัสเซียมฟอสเฟต (ไดเบสิค) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สร้างกราฟมาตรฐาน แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เอทีพีเอส แสดงค่าเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน กำหนดให้ 1 หน่วย (unit) คือจำนวนอนินทรีย์ฟอสเฟตที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

10. <u>การวัดปริมาณไนเตรต</u> (ปรับปรุงจาก J. Coombs และ Do Hall, 1982)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่มีปริมาณไนเตรต 10-200 นาโนโมล จำนวน 0.75 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดซัลฟามิกร้อยละ 10 จำนวน 0.05 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องผสมของ Vortex ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เขย่าอีกครั้งด้วยเครื่องผสมของ Vortex แล้วเติมสารละลายกรดเปอร์-คลอริกร้อยละ 20 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เขย่าอีกครั้ง วัดความเข้มข้นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectronic 2000 ค่า extinction coefficient ของไนเตรต ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 7.4 มิลลิโมลาร์$^{-1}$.เซนติเมตร$^{-1}$

11. <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u> (Lowry และคณะ, 1951)

ผสมสารละลายตัวอย่างจำนวน 0.05 มิลลิลิตร กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล จำนวน 0.05 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็น แบ่งสารละลายนี้จำนวน 0.05 มิลลิลิตร ไปผสมกับสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีนจำนวน 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 100 ส่วน ผสมกับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตร้อยละ 1 จำนวน 1 ส่วน และสารละลายโซเดียม-โปตัสเซียมตาร์เตรต ร้อยละ 2 จำนวน 1 ส่วน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารละลายฟีนอล ซึ่งเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จำนวน 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง spectronic 2000